

La insulina cinc histona en el tratamiento de la diabetes

Por A. BIASOTTI, V. DEULOFEU, J. R. MENDIVE y A. PATALANO

En 1936⁴ publicamos nuestras primeras observaciones sobre la prolongación del efecto hipoglucemiante de la insulina mediante su precipitación por la histona. Una experiencia clínica más vasta no ha hecho sino confirmar las propiedades que posee en ese sentido la insulina-cinc-histona⁵⁻⁶. Deseamos insistir aquí en los caracteres farmacológicos principales de los nuevos compuestos y en los satisfactorios resultados, inmediatos y alejados, obtenidos con los mismos preparados que utilizáramos entonces.

Desde la publicación del fundamental descubrimiento de Hagedorn y sus colaboradores¹⁶ en 1936, muchas han sido las sustancias utilizadas como precipitantes de la insulina, o las simples mezclas de insulina no precipitada, propuestas con el fin de prolongar su acción hipoglucemiante y evitar de esta manera las inyecciones múltiples en el curso del día. Las mezclas utilizadas antes de esa fecha, o no significaron un adelanto real en este sentido, o no fueron de fácil aplicación práctica. Se empleó, así, como precipitante, el cloruro férrico²³, el ácido tánico¹³, el alumbre²⁹, el cloroformo¹⁷, compuestos que, por diversos motivos, no llegaron tampoco a imponerse en la práctica; la insulina-hexametilentetramina¹¹⁻³⁷, también ha sido objeto de estudios. Pero, entre los compuestos insolubles, el que parece haber tenido mayor aceptación después de la protamina, por lo menos en Europa, es la insulina-surfén con magnesio³⁴ (el surfén no es, a diferencia de la protamina, de naturaleza proteica). Algunos de los nuevos preparados se inyectaron bajo la forma de soluciones límpidas a pH ácido: entre ellos ha recibido ya mucha aceptación la insulina-cinc-globina²⁷⁻³⁻²² y la mezcla

(*) Trabajo de la 1ª Cátedra de Clínica Médica (Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires) y del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene.

Presentado para publicar el 24 de agosto de 1943.

soluble de insulina-cinc-protamina a pH 3,4¹. La arginina, ácido diaminado y componente esencial de las protaminas e histonas ha sido también mezclada con la insulina y el cinc, con el fin de prolongar sus efectos³⁵.

La acción de los metales pesados, y especialmente del cinc en la prolongación del efecto hipoglucemiante de los diferentes preparados insulínicos, fué descubierta por Scott y Fischer³¹ con motivo de la cristalización³⁰ de la hormona y por existir cantidades relativamente grandes de ese metal en el páncreas. Los compuestos de insulina-histona con que realizamos nuestros trabajos anteriores⁵⁻⁶, llevaron siempre, de acuerdo a esos principios, pequeñas cantidades sobreagregadas de cinc, aunque fuesen preparados con insulina cristalizada que ya contiene algo de metal.

Las ventajas de los compuestos insolubles ya no se discuten en diabetología. Es posible que su empleo, que ha coincidido con la generalización de la sulfamidoterapia, haya contribuido también a disminuir el número y la gravedad de las complicaciones y a mejorar el pronóstico de las diabetes graves.

La histona, compuesto proteico simple, vecino de las protaminas, es menos básica que ellas por contener una menor cantidad de ácidos diaminados en su molécula; como la protamina, posee la propiedad de precipitar las proteínas ácidas, y entre ellas la insulina, a un pH adecuado a la combinación. Ensayada como la globina, kirina, etc., ya por el mismo Hagedorn, este autor la desechó en favor de la protamina, por ser ésta la substancia que daba con la insulina, al pH 7,2 vecino al de los tejidos donde se inyecta, el compuesto de más baja solubilidad. Proveniente del timo de ternero, su fácil obtención en la Argentina nos incitó desde un principio a ensayarla, con cuyo motivo precisamos sus propiedades y ventajas y su aplicabilidad en la terapéutica de la diabetes. Posteriormente se han realizado estudios al respecto por Gray, Bischoff y Sansum¹⁴⁻¹⁵, Barnes, Cuttle y Duncan², y por Bailey y Marble¹. En Francia, Boulin⁷⁻⁸ provisionalmente a cargo del Servicio del entonces profesor Labbé, publicó los resultados obtenidos con las muestras de insulina-cinc-histona que nosotros le facilitáramos. En la Argentina (Rosario) Vila³⁶ ha utilizado una preparación del mismo origen y estudiado sus condiciones de conservación³⁸. Joslin¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰ ha resumido últimamente su experiencia adquirida con esta substancia agregando los resultados de las investigaciones llevadas a cabo en su propia clínica por Bailer y Marble¹, sus conclusiones,

muy favorables al nuevo producto, justifican su empleo en el tratamiento de la diabetes.

Hemos ampliado aquí nuestras primeras investigaciones relativas a la insulina-cinc-histona y aportamos los resultados obtenidos con su uso prolongado en la diabetes humana. Su acción sobre la glucemia del perro diabético en ayunas y los métodos de preparación del nuevo preparado han sido también estudiados y serán descritos en el presente trabajo.

OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS INSOLUBLES DE INSULINA

La insulina-cinc-histona utilizada en estas experiencias fué preparada en el Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene a partir de histona de timo de vacuno e insulina cristalizada, las que se disuelven en agua destilada a pH 2.5 - 3.0, agregándose entonces el sulfato de cinc. Esta solución es precipitada por adición de una solución « buffer » de fosfato disódico e hidróxido de sodio, de manera que la solución final esté a pH 6.5 - 6.8. El pH final a que se debe llevar la solución depende de la histona utilizada, habiéndose encontrado que variaba con diferentes partidas de dicha proteína. Es necesario, por lo tanto, realizar experiencias previas para conocer el pH de precipitación máxima, es decir, aquel en el cual la concentración de insulina libre en el sobrenadante es menor.

El método utilizado por nosotros para la obtención de la histona es esencialmente el descrito por Félix y Harteneck¹² y consiste en extraer con agua la nucleoproteína del timo y precipitarla por adición de ácido acético. Después de filtrar, el precipitado se extrae nuevamente con agua y se repite la precipitación. El precipitado se suspende en agua y se añade hidróxido de sodio diluído con lo cual se redissuelve en parte. El ácido nucleico se precipita entonces por adición de ácido sulfúrico 1:1 hasta viraje del rojo congo. Se filtra, y en el filtrado, que es opalescente, se encuentra la histona como sulfato; la histona es entonces precipitada por adición de tres volúmenes de alcohol. El precipitado se disuelve en agua caliente y luego de filtrado se reprecipita con alcohol. La operación se repite una vez más, siendo conveniente realizar estas últimas manipulaciones en el menor tiempo posible, pues de lo contrario, la histona se disuelve con dificultad y filtra lentamente.

La insulina empleada fué casi siempre la insulina cristalizada

obtenida a partir de la insulina amorfa que se preparaba en el Instituto Bacteriológico²⁴ y que se cristalizaba con el método de Scott³⁰). Ultimamente se utilizó insulina cristalizada obtenida en forma rutinaria en el Instituto Bacteriológico aplicando el método de Romans, Scott y Fischer²⁸, con algunas modificaciones.

PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE INSULINA-CINC-HISTONA

Se disuelve en 200 ml de agua destilada, 750 mg de insulina cristalizada (22 U. I. por mg) 240 mg de histona y 120 mg de sulfato de cinc cristalizado; se agrega ácido clorhídrico hasta llevar la solución a pH 2,5 - 3,0. Por otra parte, se disuelve 9 g de fosfato disódico en 195 ml de agua destilada y se añaden 5 ml de hidróxido de sodio al 20 % (solución « buffer »).

Se hace entonces un ensayo preliminar para conocer la cantidad de la solución « buffer » que es necesario añadir a la de insulina-cinc-histona, de suerte que el pH sea el de la precipitación máxima de la insulina (generalmente varía de 6,5 a 6,8). La cantidad de « buffer » a agregar suele oscilar entre 15 y 20 ml. Se filtra en forma estéril por filtro Seitz, primero la solución de histona-cinc-insulina, luego la cantidad de « buffer » calculada, y, finalmente, agua destilada hasta un volumen de 400 ml (concentración igual a 40 U. I. por ml). En el agua destilada se disuelven, previamente a la filtración, 0,8 ml de tricresol, que actúa como conservador (concentración 2 por mil). Luego del control de esterilidad se fracciona en frasquitos de 5 ml haciendo burbujear aire estéril por la suspensión, de forma que su fraccionamiento resulta homogéneo.

La centrifugación de una suspensión así preparada da como sobrenadante un líquido claro que contiene aproximadamente 10 U. I. por ml, es decir, que alrededor del 25 por ciento de la insulina se encuentra presente solubilizado en el sobrenadante y, por lo tanto, solamente el 75 por ciento restante en el precipitado. Estas soluciones se conservan bien en la cámara fría durante meses, sin variar el pH y sin que el precipitado se adhiera a las paredes del frasco.

La suspensión de insulina-cinc-protamina se hizo utilizando protamina (B. D. H.). La cantidad necesaria de dicha proteína para los 400 mg de suspensión fué de 240 mg es decir, igual a la de la histona del preparado similar.

No haremos distinciones en el curso del trabajo entre insulina amorfa e insulina cristalizada. Aunque todos nuestros preparados

(e incluso la insulina para uso corriente que prepara el Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene) están hechos con insulina cristalizada, el uso de suspensiones de insulina-cinc-histona hechas con insulina amorfa dió, en la clínica y en la experimentación resultados similares a los obtenidos con el mismo compuesto preparado con hormona cristalizada.

RESULTADOS OBTENIDOS

A) *En el perro diabético en ayunas.* — Un primer grupo de experiencias, realizadas todas en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires, se llevó a cabo en perros diabéticos en ayunas, una vez repuestos los animales de la pancreatectomía. Se les inyectó $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ y 1 unidad de las distintas insulinas ensayadas por kilo de peso. Las curvas de glucemias se realizaron con intervalos frecuentes en el curso de las 24 horas, dejándose pasar, por lo menos, dos días entre las inyecciones de dos experiencias sucesivas. La glucosa sanguínea se determinó en sangre capilar con el método de Hagedorn-Jensen.

Una observación frecuentemente repetida permitió, gracias a la semejanza de las curvas individuales, confeccionar las curvas de la figura 1, hechas con los términos medios aritméticos de las glucemias de cuatro animales (observaciones parecidas fueron publicadas por nosotros en trabajos anteriores⁽⁶⁾). La caída inicial de la glucemia, después de la inyección de 1 unidad por kilogramo de peso de insulina-cinc-histona, es inmediata y más intensa que con la protamina (*) a la misma dosis. Su efecto hipoglucemiante es, sin embargo, menos prolongado, comenzando la glucemia a elevarse entre las doce y las catorce horas de realizada la inyección. El ascenso observado en estos momentos, aunque mucho más manifiesto que el de los animales inyectados con insulina-cinc-protamina, se realiza de una manera lenta y progresiva, lo que prueba que el organismo dispone todavía, en esas últimas horas, de parte de la insulina inyectada. En cualquiera de los casos, a las 24 horas, la glucemia se encuentra todavía algo por debajo del valor obtenido al comienzo de la experiencia. Al contrario, con las soluciones de insulina amorfa o cristalizada, el retorno a la cifra inicial sobreviene mucho antes y se desarrolla de una manera rapidísima, casi vertical.

(*) La insulina-cinc-protamina empleada en estas experiencias provino de la Casa Organon, que nos facilitó generosamente el producto.

La curva correspondiente a la insulina-cinco-histona, tal como se la observa en la figura 1, se encuentra por lo tanto en una situación intermedia entre la de la insulina-cinco-protamina, más lenta en su descenso, pero más persistente en sus efectos y la de la insulina cristalizada, de acción hipoglucemiante brusca, intensa y efímera.

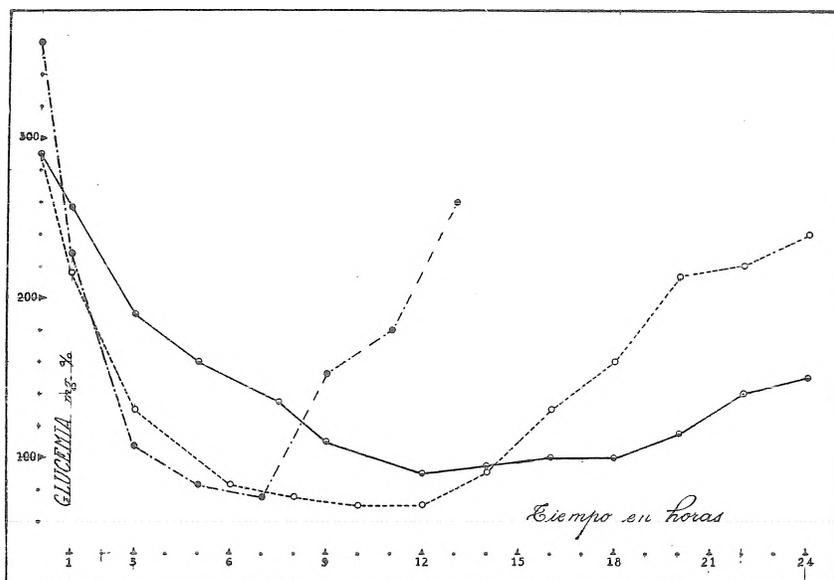


FIG. 1. — Curvas de la glucemia en perros diabéticos en ayunas.

- o - - - o - - - o Insulina-cinco-histona.
- - - ● - - ● Insulina-cinco-protamina.
- - - ● - - ● Insulina cristalizada.

Los valores de la glucemia representados en cada curva realizada con insulina insoluble (histona o protamina) se obtuvieron sacando el término medio de los valores observados en los mismos momentos en cuatro animales. Los resultados individuales, siempre semejantes entre sí y no muy dispares, fueron corregidos para una glucemia inicial de 290 mg por ciento. La curva correspondiente a la insulina soluble es muy típica y fué efectuada en un solo animal, partiendo esta vez de una glucemia mucho más alta.

B) En la diabetes humana. — Se sometió a la observación un grupo de veinte sujetos afectados de diabetes de intensidad variable, algunos de ellos del tipo juvenil, que exigían, todos, la administración de insulina para su mantenimiento.

Los efectos del tratamiento insulínico instituido pudieron ser seguidos en ellos en períodos que variaron de pocos meses a cinco años (un caso).

Las dietas se instituyeron de acuerdo a los casos individuales, pero fueron siempre relativamente ricas en hidratos de carbono (150 a 200 g por día): en las figuras 2 y 3, y en las historias clínicas citadas más abajo, están representadas someramente la composición total de algunas de ellas y su repartición. Dadas las características de la insulina-cinc-histona de que hablaremos más adelante, una parte apreciable de estos hidratos de carbono (más de las tres quintas partes) se administró a las horas del almuerzo y del té.

La insulina-cinc-histona se inyectó siempre una media hora antes del almuerzo; la cantidad de insulina varió con la gravedad de la diabetes, edad y peso del enfermo, régimen de vida y dieta, insti-

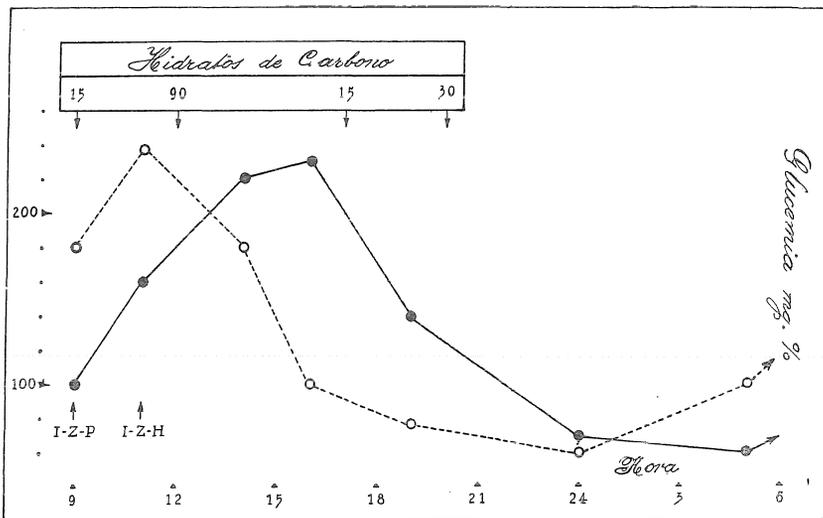


FIG. 2. — Modificaciones de la glucemia del enfermo E. M. en el curso de las 24 horas.

- ○ ○ Insulina-cinc-histona.
- — ● — ● Insulina-cinc-protamina.

Cada punto representa el término medio de varias determinaciones hechas en días sucesivos. La insulina-histona fué inyectada a las 11 horas, la protaminada a las 9 de la mañana. En la parte superior del gráfico figura protamina a las 9 de la mañana. En la parte superior del gráfico figura la repartición, en gramos, de los hidratos de carbono en los cuatro comidas del día. La glucosuria fué, en término medio, de 7 g diarios con la insulina-histona y de 8 g con la insulina protamina.

tuyéndose el tratamiento con las precauciones habituales exigidas por la terapia insulínica. Cuando el enfermo estaba ya en tratamiento con otras insulinas (soluble, protaminada), el pasaje a la insulina histona se hizo directamente y en enfermos ambulatorios de consultorio externo, con una dosis total, única y equivalente, de insulina-cinc-histona. Ninguna de los casos de este grupo pudo ser

debidamente compensado con la inyección de una sola dosis de insulina común. En ningún momento estos enfermos pudieron mantenerse sin recibir insulina de una manera prolongada, pero en muchas ocasiones, por falta de material, debieron ser tratados con insulina-cinc-protamina (*) durante lapsos más o menos largos. Algunos de ellos fueron asistidos desde la iniciación clínica de la enfermedad con hiperglucemia elevada, grandes glucosurias, poliuria intensa y pérdida de peso, sin haber realizado tratamiento anterior.

Estos síntomas fueron satisfactoriamente regulados en poco tiempo. Tanto desde el punto de vista del estado general y condiciones para el trabajo y peso como del de la hiperglucemia y glucosuria, los enfermos mejoraron como se acostumbra a ver en los tratamientos insulínicos correctamente instituidos, y esta mejoría se prolongó durante todo el período de observación.

Cuando el diabético se encontraba previamente equilibrado con una dosis diaria de insulina-cinc-protamina o con dos o más inyecciones de insulina soluble, la insulina-cinc-histona consiguió mantener la mejoría obtenida por los otros medios terapéuticos. Con este tratamiento, la glucemia de la mañana en ayunas tendió a mantenerse en límites subnormales y, en general, más elevados que los observados en los mismos enfermos cuando eran tratados con la protamina. La glucosuria, si existía, era transitoria en el curso del día y de la misma intensidad en ambos casos; no se acompañaba tampoco de eliminación de cuerpos cetónicos.

Los enfermos fueron atendidos siempre en los consultorios externos de la Cátedra de Clínica Médica y en el Consultorio de Nutrición que dirige uno de nosotros en el hospital Durand, internándolos sólo en el curso de alguna complicación o con fines de estudio.

La acción farmacológica característica de las diversas insulinas ensayadas pudo, así, ser estudiada mediante la determinación de la glucemia repetidas veces en el curso del día y de la noche en un grupo de diabéticos graves compensados, seleccionados por su deseo de colaboración. La experimentación se realizó en las condiciones siguientes: los enfermos fueron internados libres de toda complicación, o bien se comenzó la observación ya en plena convalecencia, lejos de la enfermedad que motivara su hospitalización. Durante algunos días se trató de mantenerlos sin tratamiento insulínico, asis-

(*) Cedida gentilmente por la casa E. Lilly Co., o preparada por nosotros en el Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene con destino a los nosocomios de la Asistencia Pública de la Ciudad de Buenos Aires.

tiéndose a la rápida e intensa elevación de la glucemia y glucosuria. La insulina soluble en una sola inyección diaria antes del almuerzo produjo, como es habitual, una rápida disminución del azúcar sanguíneo en las primeras horas siguientes, sin prolongar su efecto más de seis horas. Estos resultados no están representados en las figuras 2 y 3, donde nos limitamos a presentar los efectos de la insulina-cinc-histona y a comparar sus resultados inmediatos con los obtenidos, en las mismas personas, con la insulina-cinc-protamina.

Los períodos de observación duraron varios días para cada insulina, comenzándose la experiencia después de llevar el enfermo tres días, por lo menos, bajo la acción de la insulina en estudio. Los resultados de las figuras 2 y 3 representan el término medio aritmético de varias determinaciones hechas en el mismo enfermo en días diferentes, a la misma hora y con la misma dieta.

La insulina-cinc-protamina se inyectó siempre a la mañana, antes del desayuno. La insulina-cinc-histona, en razón de la insulina soluble, de acción rápida, que contiene el sobrenadante, treinta minutos antes del almuerzo. La repartición de los alimentos en las diferentes comidas y, en particular, la de los hidratos de carbono se modificó según los casos.

El primero de los enfermos, E. M., italiano, de 51 años y 56 kg de peso, zapatero, con antecedentes diabéticos familiares, se sentía enfermo desde hacía diez años. La evolución progresiva de su enfermedad hizo necesaria la administración de insulina para su mantenimiento; en dos ocasiones en que, por razones de orden económico, suprimió el medicamento, debió ser internado en el hospital Durand (Servicio del Profesor Romano) en acidosis y coma. Actualmente, con un régimen relativamente rico en hidratos de carbono (hidratos de carbono: 160 g; proteínas: 90 g; grasas: 100 g) y 60 unidades de insulina-cinc-histona se mantiene satisfactoriamente en su estado general y peso, casi constantemente aglucosúrico, y en condiciones de glucemia semejantes a las que están representadas en la figura 2. Está en tratamiento bajo nuestra observación directa desde hace casi un año.

Las variaciones de la glucemia durante el día fueron muy significativas en este enfermo sometido al régimen cuya composición y repartición se aprecian en la figura 2. La insulina protaminada (60 unidades) no impidió, a pesar de haber sido inyectada tres horas antes, una hiperglucemia manifiesta después de un almuerzo rico en hidratos de carbono (90 gr; tres quintas partes del total administrado en 24 horas). A las 19 horas, sin embargo, la gluce-

mia había retornado a 140 mg por ciento y siguió bajando, aunque más lentamente, hasta las 9 horas del día siguiente. La glucosuria, discontinua, osciló alrededor de los 8 g en 24 horas.

La insulina-cinc-histona a la misma dosis, pero inyectada inmediatamente antes de la comida de medio día, produjo una disminución rápida de la glucemia entre las 12 y las 16 horas, más lenta después, hasta las 24 horas, en que llegó a 60 mg por ciento. A partir de este momento comenzó a elevarse lenta y progresivamente hasta llegar a 180 mg a las 9 horas de la mañana y mucho más rápidamente en las últimas horas de la mañana y a pesar de lo frugal del desayuno, hasta 240 mg por ciento.

La glucosuria, que correspondió exclusivamente a este período de hiperglucemia y fué, por lo tanto, también intermitente, no sobrepasó de 7 g por día. Es evidente que las características del descenso de la glucemia observado después del medio día hubieran permitido la administración de una pequeña dosis sobreañorada de hidratos de carbono en el almuerzo y en el te de la tarde.

En términos generales, con esta repartición de los hidratos de carbono, la insulina-cinc-protamina no evitó la hiperglucemia postprandial; la insulina-cinc-histona, al contrario, permitió administrar una cantidad apreciable de ellos en el almuerzo, pero no mantuvo sus efectos hasta las veinticuatro horas de inyectada, como fué el caso de la protamina. La glucosuria del día fué igual en ambos casos.

En el caso siguiente, afectado por una diabetes menos grave que el anterior, la repartición de los hidratos de carbono y de los otros constituyentes del régimen se hizo de una manera más regular en las cuatro comidas del día, aunque menos de acuerdo a las modalidades de nuestro país.

H. E., austríaco, de 58 años y 64 kg de peso, comerciante. Su enfermedad empezó a los 43 años con poliuria y pérdida de peso. Desde entonces, el trastorno hidrocarbonado, que evolucionó sin complicaciones importantes, fué tratado con régimen e insulina de una manera constante. Actualmente, la dieta, cuidadosamente seguida, comporta 150 g de hidratos de carbono, 100 g de proteínas y 80 g de grasas, con un aporte aproximado de 1.800 calorías. Esto exige 40 unidades diarias de insulina-cinc-histona, manteniéndose el sujeto en un peso satisfactorio, excelentes condiciones generales, constantemente aglucosúrico y con glucemias parecidas a las observadas en la figura 3. Sin insulina, se asiste en este enfermo, que venimos observando desde hace nueve meses, a una rápida descompensación.

La figura 3, muestra que, con un aporte más reducido de hidratos de carbono (120 g en 24 horas) y, sobre todo, con su repartición más proporcional en las cuatro comidas, la glucemia se mantuvo en límites casi normales cuando se inyectaron 40 U. de insulina-cinc-protamina a la mañana, a las 9 horas. Bajo la acción de la insulina-cinc-histona a la misma dosis inyectada a las 11, las glucemias de las últimas horas de la mañana oscilaron entre 150 y 175 mg por ciento, para descender después de la inyección y del almuerzo (relativamente pobre en hidratos de carbono) a 85 mg por ciento a las 14 horas. A partir de este momento, la glucemia se elevó hasta las 9 h del día siguiente, y, desde entonces, de una manera más brusca. En ambos casos no se eliminaba azúcar por la orina.

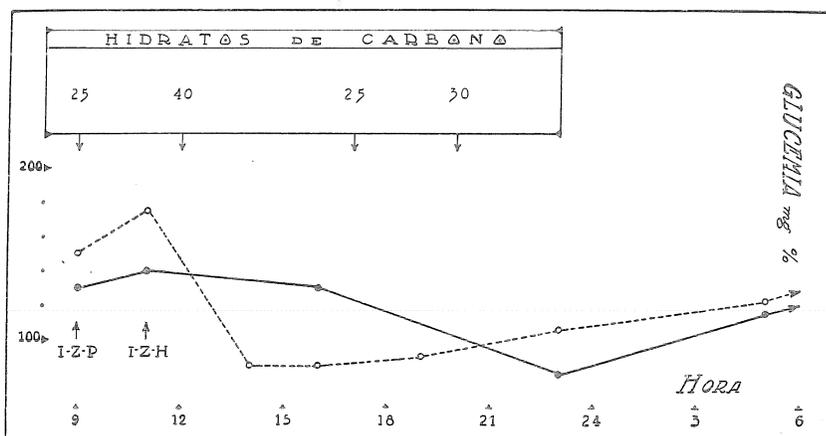


Fig. 3. — Modificaciones de la glucemia del enfermo H. E. en el curso de las 24 horas.

o o o Insulina-cinc-histona.

● — ● — ● Insulina-cinc-protamina.

Mismas referencias que en la Fig. 2. El enfermo se mantuvo en este caso constantemente aglucosúrico.

Fué evidente que en este enfermo la reducción de los hidratos de carbono y, sobre todo, su repartición en proporciones semejantes contribuyeron a evitar la hiperglucemia postprandial habitualmente observada después del almuerzo del sujeto diabético sometido a la insulina-protamina. La histona inyectada antes del almuerzo, produjo al contrario, una reducción rápida y relativamente marcada de la glucemia, no prolongándose tanto su efecto hipoglucemiante como el de la protamina: la glucemia a la mañana fué, como siempre, más elevada con la insulina-histona.

En un pequeño número de casos (niños con diabetes graves que

exigían más de 40 U. de insulina, diabéticos acromegálicos, diabetes complicadas), el trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono no pudo ser suficientemente controlado con la insulina-histona, a juzgar por los datos suministrados por la glucemia en ayunas y por la eliminación de glucosa en 24 horas. La insulina-cinc-protamina tampoco conseguía en ellos regularizarlo en grado más satisfactorio. Cabe recordar, sin embargo, que, como se continuara por razones de comodidad con el tratamiento de una dosis diaria de insulina-cinc-histona, el peso y el estado general mejoraron considerablemente y se mantuvieron en forma satisfactoria de una manera prácticamente indefinida.

Igual observación fué realizada en diabéticos que, aunque graves también no se sujetaban casi a régimen alguno, cometiendo toda clase de transgresiones alimenticias. Uno de ellos, un joven de 28 años con 8 años de antigüedad en su enfermedad, se inyecta 80 a 100 U. de insulina-cinc-histona en una inyección matinal desde hace varios años (aunque alternando este tratamiento con insulina protaminada) sin desmejoramiento de su estado general sin sufrir complicaciones y sin abandonar el pesado trabajo a que se dedica. Este caso es semejante a los presentados por Tolstoi (³²) en su grupo de 27 sujetos diabéticos tratados con insulina-cinc-protamina y descuidados en lo que atañe a la intensidad de la glucosuria.

En dos casos prolongados de tuberculosis pulmonar, sobrevenida en sujetos jóvenes diabéticos, empleamos asimismo la insulina-cinc-histona a altas dosis, al mismo tiempo que se continuaba el neumotórax terapéutico ambulatorio. Las complicaciones infecciosas banales tampoco exigieron cambios en la insulina de nuestros enfermos tratados, modificándose solamente el régimen y la dosificación total de insulina-histona en algunos de ellos.

No tenemos experiencia suficiente con el uso de la insulina-cinc-histona en la acidosis diabética grave, en la que la mayoría de los autores desaconseja el empleo, por lo menos en forma exclusiva, de insulina insoluble. No hemos practicado tampoco tratamientos mixtos de insulina-cinc-histona con insulina común.

Fué tratado, finalmente, con insulina-cinc-histona, un elevado número de enfermos con diabetes más benignas, que en cierto momento de la enfermedad necesitaron insulina provisionalmente, en razón de una descompensación de distinto origen (generalmente transgresiones dietéticas o complicaciones infecciosas, diabetes benignas en su iniciación clínica, pruritos diabéticos, etc.). El tratamiento se mostró eficaz, siendo administrado en todas las ocasiones de acuerdo a las normas establecidas más arriba.

Se han observado hipoglucemias con el uso de nuestros preparados de insulina-cinc-histona: el análisis de las curvas de las figuras 1, 2 y 3, explica bien su hora de aparición: a la tarde, si el producto es inyectado, como es habitual, antes del almuerzo. Sin alcanzar proporciones alarmantes el hecho de sobrevenir en pleno período de absorción alimenticia, quita probablemente gravedad y duración a la complicación; ella parece, sin embargo, más frecuente con este tipo de insulina que con la protaminada. Es posible que la diferencia de niveles de glucemia y no solamente la hipoglucemia en cifras absolutas influya en la aparición de algunos de sus síntomas. Como con las protaminas, sin embargo, no es raro observar glucemias bajas sin exteriorización clínica alguna.

Las relaciones *in situ* (nódulos subcutáneos) pueden originarse en algunos casos, no habiendo asistido nunca al desarrollo de atrofiás locales. Tampoco observamos, en el curso de estos últimos años reacciones alérgicas generales a la insulina o a la histona.

COMENTARIOS

El estudio de la acción hipoglucemiante de la insulina cinc-histona en el perro y en el hombre diabéticos justifican su empleo a la dosis única diaria con que se acostumbra administrar la insulina protaminada. Las características principales de la suspensión de histona parecen depender, esencialmente, de la presencia de una cierta porción de insulina disuelta en el líquido sobrenadante. En nuestras últimas preparaciones, esta proporción fué de un 25 por ciento, es decir, que, en un mililitro conteniendo cuarenta unidades de principio activo, treinta unidades se encontraban precipitadas por la histona y las diez restantes al estado soluble. Cabe recordar que las histonas diferentes dan precipitados diferentes, por lo que la dosificación biológica del principio activo debe llevarse a cabo siempre en el líquido sobrenadante de las mezclas de insulina con histona de distinto origen. Los preparados protamínicos de insulina al pH 7,3 en que son utilizados no contienen prácticamente nada de insulina solubilizada.

La acción rápida de la insulina-cinc-histona se debe, por lo tanto, a la porción de insulina soluble que contiene. Su efecto hipoglucemiante, algo menos prolongado que el provocado por la insulina-protamina a la misma dosis, resultaría entonces de una cantidad menor de precipitado inyectado. Tal criterio puede ser aceptado, pero sólo provisionalmente, pues nada sabemos del ritmo de diso-

ciación y liberación del principio activo contenido en las diferentes suspensiones de este tipo a nivel del tejido subcutáneo.

La mezcla de insulina-cinc-histona realiza a la vez, y con una sola inyección diaria, un tratamiento mixto de insulina soluble y precipitada; la primera, de acción rápida, capaz de evitar la hiperglucemia de la primera comida consecutiva a la inyección, la segunda, de efectos lentos y prolongados hasta casi las 24 horas, eficaz en la manutención del organismo, en el curso del día, bajo la acción de una cierta proporción de insulina.

Parece también probable que la insulina-cinc-histona permita administrar una cantidad mayor de hidratos de carbono con la condición de incluirlos en una proporción apreciable (tres quintas partes o más) en la comida de medio día y a la hora del te de la tarde. Esta práctica, por otra parte, de acuerdo a las modalidades alimenticias de los países latinos y a las necesidades de la vida activa de muchos pacientes, no se acompaña de la hiperglucemia postprandial de la protamina (en los países sajones, la hiperglucemia correspondiente a la primera comida consecutiva a la inyección de insulina-cinc-protamina aparece generalmente después del copioso desayuno de la mañana). Una de las condiciones que hace más satisfactorio el uso de la protamina consiste precisamente en una reducción global de los hidratos de carbono y en su repartición muy homogénea en el curso del día (Marks ²²), conducto que, a menudo, incluye la administración de una cierta proporción de ellos durante la noche.

Esta última práctica se aconseja con el fin de evitar la hipoglucemia tardía de la insulina protaminada que aparece tarde a la noche o en la madrugada; es esta hipoglucemia la que limita las dosis de insulina-protamina administrable y la que, con la hiperglucemia postprandial, desde los comienzos de su empleo (Kerr y Best ²¹; Campbell, Flechter y Kerr ⁹) hizo deseable disponer de una insulina de efectos inmediatos más rápidos y de acción alejada algo menos manifiesta y prolongada. A su vez, lo que limita la cantidad de insulina-cinc-histona es la hipoglucemia de la tarde, contra la cual no será tampoco posible administrar excesivas cantidades de hidratos de carbono sin inconvenientes para una satisfactoria compensación en el resto del día.

La figura 4 muestra la acción de una comida mixta, pero excesivamente rica en hidratos de carbono en una diabetes grave sometida a la acción de la insulina-cinc-protamina y de la insulina-cinc-histona. El diferente grado de tolerancia presentado en ambos casos puede ser utilizado con fines terapéuticos cuando convenga ad-

ministrar al diabético una cantidad relativamente grande de hidratos de carbono. En la figura 5 se representan las glucemias postprandiales en una diabetes más benigna y una comida más restringida en hidratos de carbono; estas curvas fueron realizadas también con el fin de comparar los efectos inmediatos de ambas formas de insulina.

Nuestros resultados primeros han sido, así confirmados por trabajos casi simultáneos de Bray, Bischoff y Sansum¹⁴⁻¹⁵ y por los de Barnes, Cutile y Duncan² y Bailey y Marble¹, y por las observaciones que aquí presentamos. Aunque esos autores no indican cantidades precisas de insulina soluble en el sobrenadante, es posible que las suspensiones de histona e insulina que preparamos en

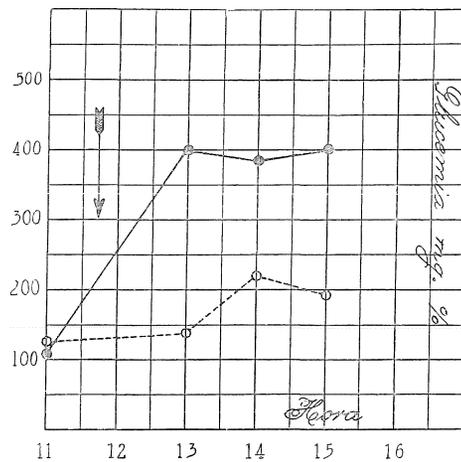


Fig. 4.

- o ... o ... o Insulina-cinc-histona.
- — ● — ● Insulina-cinc-protamina.

Acción de una comida mixta, pero rica en hidratos de carbono (más de 150 g) en un caso de diabetes grave sometido a la acción de la insulina-histona y de la insulina-protamina. La primera se inyectó media hora antes de la ingestión de los alimentos (indicada por una flecha); la segunda a las 9 horas de la mañana del mismo día, es decir, casi tres horas antes.

la Argentina contengan cantidades mayores de insulina soluble que los mismos productos americanos. Su efecto alejado parece, al contrario, menos manifiesto que el obtenido por ellos.

Bailey y Marble¹ y Joslin¹⁹⁻²⁰, que son los más entusiastas en su empleo, señalan los excelentes resultados obtenidos clínicamente en aquellas diabetes (especialmente juveniles) que exigen más de 40 U. diarias. La razón de esta preferencia reside en la misma causa que ha justificado el éxito de los tratamientos mixtos en las

formas más graves de diabetes, al evitar la hiperglucemia postprandial y permitir una mayor tolerancia a los hidratos de carbono. Por otra parte, nada hace aconsejable, para una droga que debe ser administrada cada día, que sus efectos, a veces contraproducentes, se prolonguen mucho más de 24 horas. En las formas más graves de diabetes, y muy frecuentemente las sobrevenidas en los sujetos jóvenes o en algunas diabetes complicadas, la insulina-cinc-protamina no basta para ejercer un control satisfactorio en la enfermedad; la mayoría de los diabetólogos (Joslin ¹⁹⁻²⁰, Colwell ¹⁰, Ralli ²⁶, Perk ²⁵) combinan entonces, con la insulina-protamina de la mañana, una dosis más pequeña de insulina soluble inmediatamente antes del desayuno, generalmente abundante, de los anglosajones. En la Ar-

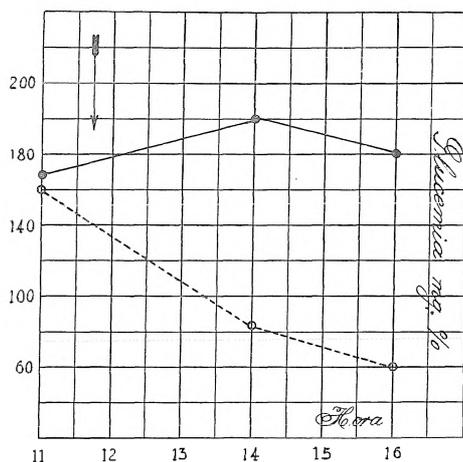


FIG. 5.

- o - - - - o Insulina-cinc-histona.
 ● - - - ● Insulina-cinc-protamina.

Acción de una comida mixta más restringida en hidratos (90 g) que la de la Fig. 4, en un caso de diabetes menos grave, sin tratamiento insulínico los días anteriores a la prueba. Se inyectaron aquí 20 U. de insulina.

gentina, salvo modificaciones en la repartición habitual del régimen, esta forma de tratamiento podría cambiarse ventajosamente inyectando ambas insulinas, aunque separadamente, antes del almuerzo.

Las numerosas tentativas hechas con el fin de mezclar insulinas y evitar así una segunda inyección, dieron malos resultados que provinieron de la precipitación de la insulina soluble en un exceso de protamina. Ya Kerr y Best ²¹, en 1937, utilizaron con este objeto mezclas muy pobres de protaminas, con resultados satisfactorios, pero irregulares, posteriormente, Ulrich ³³ y Colwell ¹⁰ trataron de

resolver el problema de insulina protaminada; pero este procedimiento invierte la dosificación aconsejable de cada una de estas formas.

Desde un principio consideramos que la insulina-histona con cinc podría realizar un tratamiento mixto de ese tipo, gracias a la insulina soluble de su sobrenadante contenido en nuestros preparados y quizás también en los de Bailey y Marble (*). La experimentación prolongada nos ha confirmado en nuestras presunciones.

Algunas aclaraciones serán, sin embargo, necesarias a la más correcta interpretación de los datos habituales obtenidos por el laboratorio y utilizados por el médico de la vigilancia del diabético. La glucosuria del enfermo tratado con insulina-cinc-protamina, si existe, aparece de una manera intermitente y coincidiendo con la hiper glucemia postprandial. La dosificación del azúcar en la sangre extraída a la mañana temprana en ayunas, de tanta importancia en la vigilancia del diabético, representa en este caso casi la glucemia más baja de las 24 horas.

En el enfermo sometido a la insulina-cinc-histona las glucemias de la mañana son las más altas del día, siendo entonces que puede sobrevenir una glucosuria de proporciones totales poco importantes y que no se repetirá en el curso del día. Esta modificación de la glucemia bajo la acción de las diferentes insulinas, observables tanto en el perro diabético como en clínica humana, obligan a interpretar debidamente el conjunto de informes proporcionados por los exámenes de rutina. Los datos obtenidos del examen clínico prolongado (peso, crecimiento, fuerzas, capacidad para el trabajo, ausencia de complicaciones derivadas del estado diabético), son fundamentales en la valoración de los resultados de un tratamiento hormonal de este tipo.

RESUMEN

1º Un grupo de diabéticos de 8 a 64 años de edad, de gravedad variable, pero que requieren siempre insulina para su mantenimiento, fueron sometidos a la mezcla de insulina-cinc-histona durante períodos de tiempo que oscilaron de algunos meses a cinco años. Los enfermos fueron mantenidos muy satisfactoriamente, tanto desde el punto de vista del metabolismo de los hidratos de car-

(*) La Casa E. Lilly Co. de EE. UU. de N. A. preparó las sustancias utilizadas por ellos.

bono como en lo referente a su estado general, peso, crecimiento, aptitud para el trabajo, ausencia de complicaciones graves, etc.

2° La insulina-cinc-histona mantiene, en el curso de las 24 h. del día, en límites satisfactorios, la glucemia de los sujetos diabéticos graves o de mediana intensidad sometidos a regímenes relativamente ricos en hidratos de carbono. Un efecto semejante fué observado en el perro con diabetes pancreática en ayunas. La intensidad y la prolongación del efecto hipoglucemiante fueron comparados en cada caso con los de la insulina cristalizada y la insulina-cinc-protamina. Por la rapidez de su acción y la prolongación de sus efectos, la insulina-cinc-histona preparada por nosotros presenta una actividad intermedia entre la insulina-cinc-protamina, más lenta en su descenso, pero más persistente, y la insulina cristalizada, de acción hipoglucemiante brusca, intensa y efímera.

3° La suspensión del precipitado de insulina-cinc-histona, cuyo método de preparación se describe, contiene insulina libre, soluble, en el líquido sobrenadante. De este hecho parecen depender sus principales características farmacológicas. Su empleo puede llenar las condiciones exigidas por los tratamientos mixtos de insulina soluble con insulina precipitada, considerados como los más convenientes en la diabetes severa.

4° Dada la facilidad de obtención de la histona (extraída del timo de ternero) en la Argentina, la mezcla insulina-cinc-histona aparece como doblemente aconsejable en esta época de guerra en que la existencia de protamina depende del comercio exterior.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BAILEY, C. C., and MARBLE, A. — *Histone zinc insulin, globin (zinc) insulin and clear protamine insulin*. *J. Amer. Med. Ass.*, 1942, **118**, 683.
- (2) BARNES, CH.; CUTTLE, T. D., and DUNCAN, G. G. — *Histone zinc insulin. Its, pharmacologic characteristics and its application in the treatment of diabetes mellitus*. *J. Pharm. and Exp. Ther.* 1941, **72**, 331.
- (3) BAUMAN, L. — *Clinical experience with globin insulin*. *Amer. J. Med. Sci.*, 1939, **198**, 475.
- (4) BIASOTTI, A.; DEULOFEU, V., and MENDIVE, J. R. — *Hypoglycemic action of histone insulin*. *Nature (London)*, 1936, **138**, 1101.
- (5) BIASOTTI, A.; DEULOFEU, V., y MENDIVE, J. R. — *Acción de la insulina-histona sobre la glucemia*. *Pr. Med. Argent.* 1937, **24**, 1122.
- (6) BIASOTTI, A., y PATALANO, A. — *Acción de los compuestos insolubles en el tratamiento de la diabetes. Insulina-protamina. Insulina-histona*. *Rev. Asoc. Méd. Argent.*, 1938, **52**, 435.
- (7) BOULIN, R., et BONNET, G. — *L'insuline histone*. *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hop. Paris*, 1939, **55**, 535.

- (8) BOULIN, R., et BONNET, G. — *L'insuline histone. Médecine*, 1939, **20**, 537.
- (9) CAMPBELL, W. R.; FLETCHER, A. A., and KERR, R. B. — *Protamine insulin in the treatment of diabetes mellitus. Amer. J. Med. Sci.*, 1936, **192**, 589.
- (10) COLWELL, A.; IZZO, J. L., and STRYKER, W. A. — *Intermediate action of mixtures of soluble insulin and protamine insulin. Arch. Int. Méd.* 1942, **69**, 931.
- (11) FEINBLATT, J. — *Juvenile diabetes. A comparative study of standard insulin, crystalline insulin and hexamine insulin. J. Lab. and Clin. Med.*, 1939, **24**, 337.
- (12) FÉLIX, K., und HARTENERK, A. — *Ueber den Aufbau des Histons der Thymsdrüsen. Ztschr. physiol. Chem.* 1926, **157**, 76.
- (13) GRAY, P. A. — *Treatment of diabetes mellitus with insoluble insulin compounds. Endocrinology*, 1936, **20**, 461.
- (14) GRAY, P. A.; BISCHOFF, F., and SANSUM, W. D. — *Treatment of diabetes mellitus with insoluble insulin compounds: II. Histone insulin. Ann. Inst. Med.*, 1937, **11**, 274.
- (15) GRAY, P. A.; BISCHOFF, F., y SANSUM, W. D. — *Insulina histona. Prens. Méd. Argent.*, 1939, **26**, 673.
- (16) HAGEDRON, H. C.; JENSEN, B. N.; KRARUP, N. B., and WODSTRUP, L. — *Protamine insulinate. J. Amer. Med. Asso.*, 1936, **106**, 177.
- (17) JOSLIN, J. M. — *Attenuation of insulin by adsorption. Endocrinology*, 1941, **29**, 574.
- (18) JOSLIN, E. P. — *The treatment of diabetes. Med. Clin. of North. Amer.*, 1941, **25**, 1213.
- (19) JOSLIN, E. P. — *The use of insulin in its various forms in the treatment of diabetes. Bull. New York Acad. Med.*, 1942, **18**, 200.
- (20) JOSLIN, E. P. — *El empleo de la insulina y sus diversas formas en el tratamiento de la diabetes. (Traducción de 19). Rev. Asoc. Méd. Argent.*, 1942, **56**, 662.
- (21) KERR, R. B., and BEST, C. H. — *The effects of protamine insulin and related compounds in normal and depancretized dogs. Amer. J. Med. Sci.*, 1937, **194**, 149.
- (22) MARKS, H. E. — *A new globin insulin. The importance of carbohydrate distribution in the control of diabetes with the modified insulin. Med. Clin. of North Amer.*, 1940, **24**, 649.
- (23) MAXWELL, L. C., and BISCHOFF, F. — *Augmentation of physiologic response to insulin. Amer. J. Physiol.*, 1935, **112**, 172.
- (24) MENDIVE, J. R. — *Método de preparación de insulina y derivados. Folia Biol.*, 1937, 347.
- (25) PECK, F. B. — *Therapeutic application of the various insulins. South Med. and Surg.*, 1941, **103**, 539.
- (26) RALLI, E. P.; BRANDLEONE, H., and FEIN, H. D. — *Observations on the comparable effects of protamine zinc and regular insulin in diabetic patients followed over a period of years. Ann. Int. Med.*, 1942, **16**, 750.
- (27) REINER, L.; SEARLE, D. S., and LANG, E. H. — *Hypoglycemic activity of globin insulin. J. Pharmac. and Exp. Ther.*, 1939, **67**, 330.
- (28) ROMANS, R. G.; SCOTT, D. A., and FISHER, A. M. — *Preparation of crystallin insulin. Indust. and Eng. Chem.*, 1940, **32**, 908.
- (29) ROSENTHAL, L.; FIALKA, S. M., and KAMLET, J. — *A clinical study of alum-precipitated insulin. Amer. J. Med. Sci.*, 1939, **198**, 98.
- (30) SCOTT, D. A. — *Crystalline insulin. Biochem. J.*, 1934, **28**, 1592.

- (31) SCOTT, D. A., and FISHER, A. M. — *Studies on insulin with protamine. J. Pharm. and Exp. Ther.*, 1936, **58**, 78.
- (32) TOSLTOI, E., and WEBER, F. C. — *Protamine zinc insulin. Clinical study Arch. Int. Med.*, 1940, **66**, 678.
- (33) ULRICH, H. — *Clinical experiments with mixtures of standard and protamine zinc insulins. Ann. Int. Méd.*, 1941, **14**, 1166.
- (34) UMBER, F. — *Erfolge der Depotinsulinbehandlung. Deutsch med. Wochens.*, 1938, 1025.
- (35) VARTIAINEN, I., and BASTMAN, L. — *Retardation of the effect of insulin by means of arginine. Acta. Med. Scand.*, 1939, **98**, 318.
- (36) VILA, O. — *Las insulinas de depósito b) La insulina histona. Rev. Med. Rosario*, 1938, **28**, 1212.
- (37) VILA, O. — *La hexamina insulina: estudio clínico. Rev. Méd. Rosario*, 1942, **32**, 965.
- (38) VILA, O., y VILA, I. F. DE. — *Consideraciones sobre el envejecimiento de las insulinas de depósito. Rev. Med. Rosario*, 1941, **31**, 249.