
LA MOLECULA DE LA "INSULINA" Y EL METODO PARA DEMOSTRARLA INTRACITOPLASMICAMENTE

VICENTE SUÁREZ SOTO
Puebla, Pue.

La insulina, hormona elaborada en el bioplasma de las células beta de los islotes de Langerhans pancreáticos, se encuentra estructurada por moléculas de una talla enorme, dicho edificio molecular químicamente es de naturaleza proteica, integrado por un corto número de aminoácidos.

En los años que precedieron a la guerra, investigadores ingleses abordaron el estudio de la estructura de las moléculas proteicas por el método de la radiocristalografía, pero la guerra paralizó dichos estudios y no fue sino hasta últimas fechas en que se han reanudado. Las investigaciones de d'Astbury (1), empleando cristales únicos de un grueso menor de 0.2 mm hicieron real el examen detallado de cristal-moléculas de insulina, hemoglobina y lactoglobulina.

El estudio de la insulina, se encuentra basado en el examen de placas fotográficas tomadas a cristales-moléculas de esta hormona, empleando para la impresión de dichas placas, la propiedad de esos cristales de difractar los rayos X; por el examen de muchas de esas placas se reconoce la gran talla de las mallas elementales de dichas moléculas y su simetría en el espacio.

Para llegar a tener las placas con las fotografías de los cristales, se han tenido que eliminar varias dificultades experimentales, por ejemplo: la inestabilidad de dichos cristales expuestos al aire, la pérdida de su naturaleza cristalina al perder el cristal su agua madre, puesto que al perder su agua de cristalización, desaparecen en cierta medida las características de su estructura cristalina; es por lo mismo muy importante, desde este punto de vista, la rapidez y perfección del secado; toda esta serie de dificultades, por otra parte, se tienen que sumar a las condiciones primordiales de la investigación, que en sí también son muy difíciles de conseguir; por ejemplo: cristales de la talla anteriormente dicha de menos de 0.2 mm. tienen que colocarse dentro de un tubo capilar de borosilicato, que es transparente a los rayos X, estos cristales deben orientarse en el sentido de tener su eje de cristalización paralelo al eje del tubo capilar; esta condición es una de las más difíciles de satisfacer, puesto que representa el grado de habilidad del investigador, Amorós (2), (3), (4), (5).

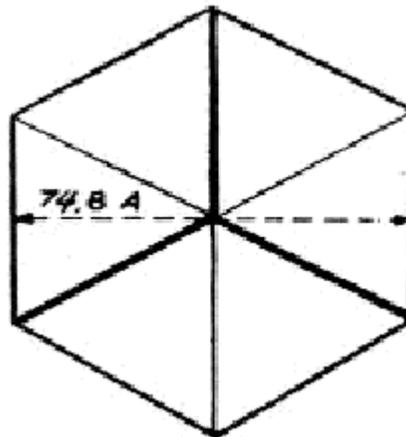


Fig. 1. Malla elemental del cristal-molécula de insulina, vista por arriba.

En el caso de la molécula de la insulina, la malla de un cristal seco, es un romboedro muy aplanado (figs. 1 y 2); corresponde a la forma extrema de una sola molécula, según la señorita Crowfoot (6), dicha malla tendría forma de prisma de base hexagonal con una longitud de 43 \AA y una altura de 30 \AA ; su simetría desde el punto de vista cristalográfico, corresponde al sistema ternario.

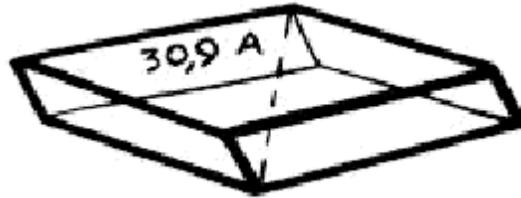


Fig. 2. La misma malla del cristal-molécula, vista lateralmente.

LAMINA 1



Corte del páncreas de perro, en el que se aprecian ciertas partículas negras que corresponden al azufre precipitado por el reactivo, en las células beta del islote de Langerhans.

Coloración a la hematoxilina virada con carbonato de sodio al 2%.

Durante el secado del cristal de insulina, se originan fenómenos de retracción, que cambian la orientación relativa de los componentes quimicofísicos de la molécula (figs. 3 y 4); la estructura molecular como se ve en las

proyecciones de Patterson, se puede representar por un motivo hexagonal de puntos; en el cristal seco la mezcla de los componentes moleculares es mucho más compacta, pero en los dos cristales, tanto en el húmedo como en el seco, se les encuentra agua madre; en la representación por puntos la distancia entre ellos es de 10 \AA , respecto de los diámetros que estructuran el edificio en el espacio, se indicó que tiene tres importantes vectores interatómicos de 5 \AA (figs. 5 y 6).



Fig. 3. Cristal húmedo de insulina.

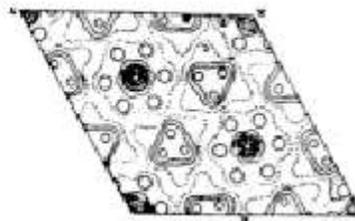


Fig. 4. Cristal seco de insulina.

Proyecciones de Patterson, para los cristales de insulina.

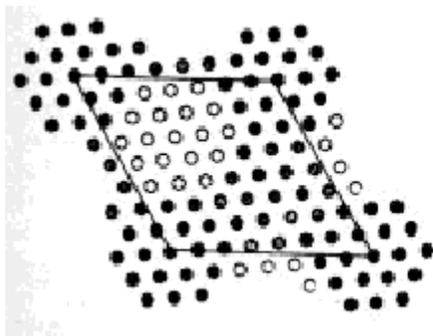


Fig. 5. Cristal húmedo de insulina.

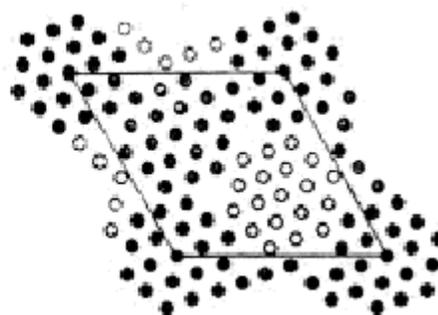


Fig. 6. Cristal seco de insulina.

Disposición de los motivos hexagonales de puntos en los cristales de INSULINA; es de recordar, que entre punto y punto hay una distancia de 10 \AA que los separan entre sí.

El peso atómico de la molécula insulínica, rectificado para un tenor de agua de 10,1% es de 35,600 (7), (8), (9), (10), si bien en su primer comunicado la señorita Crowfoot admite un tenor de agua de 5,35% y por lo tanto un peso molecular de 37,600; uno de los datos de la escuela de Svedberg, es admitir un peso de 35,100 medido por el método del equilibrio y de 41,100 por el de difusión (11), Miller y Anderson (12), revisan los valores y dan un peso más elevado que determinan en 46,000, Chibnall por el análisis químico encuentra uno mucho más bajo 12,000 (13); pero el efectivo debe de admitirse como múltiplo del de 12,000, pues por examen a los rayos X, se encuentra que el edificio molecular se compone de 3 partes o subunidades, de cualquier modo hay ciertas anomalías que necesitan su explicación.

Respecto del tamaño de la talla molecular insulínica, podemos indicar que se encuentra entre dos límites extremos, bien un prisma de base hexagonal con 43 \AA de longitud y 30 \AA de altura o bien elipsoide aplanado con

una altura de 30 Å y un diámetro de 75 Å.

DATOS CRISTALIGRÁFICOS DE LA INSULINA, (14), (15).

Estado	a	b	c	B	Vol. en A=	n.	Vol. por molécula	Densidad	Peso mol. en agua
Húmedo	144	83	34	90	404.000	6	67.000	1.28	54.400
Seco al aire	130	74	30	90	298.000	6	50.000	1.312	39.700

Estado	Peso molecular por tenor ag.	Grupo espacial	La más pequeña distancia interreticular
Húmedo		R3	2.4
Seco al aire	35.600	R3	7

1. Los valores dados, se recordará, son sobre malla hexagonal.
2. La malla romboédrica $a = 49,4$ $\alpha = 114^\circ 16'$ $n = 1$ cristal húmedo.
 $a = 44,4$ $\alpha = 114^\circ 28'$ $n = 1$ cristal seco.
3. a, b, c, son las dimensiones, y alfa, beta y gamma, los ángulos de la malla; la más pequeña distancia interreticular, corresponde a la mancha lejos del hacecillo incidente y mide la perfección del cristal.

Todo lo anotado más arriba, corresponde a la estructura física de la molécula insulínica respecto de la composición química de ella, indicaremos que su naturaleza proteica explica su peso molecular, pues se encuentra integrado el edificio proteico por varios aminoácidos, que hacen elevar el peso total de la molécula.

Fue Dudley (16), quien demostró completamente la presencia de azufre orgánico en la insulina; Abel y Geiling (17), encontraron la relación entre el azufre de la molécula insulínica y la acción hipoglicémica de la misma; Du Vigneaud, Jensen y Wintersteiner (18), confirmaron que el azufre es de la molécula de cistina y que entra ella en un 12% del edificio molecular insulínico, y al cristalizar dicha molécula hormonal queda con un 8,3% de cistina solamente, Miller y Du Vigneaud (19).

Los anteriores autores encontraron igualmente los siguientes ácidos aminados: arginina, histidina, lisina leucina y ácido glutámico, todos ellos formando un 40% de la hormona.

Florence (20), vio cómo al purificar a la insulina aumentaba el porcentaje de histidina; el mismo autor observó que la arginina tiene en su composición el grupo guanidínico específico, cuya acción hipoglicémica ha sido netamente demostrada.

Igualmente, Du Vigneaud encontró un 12% de tirosina; Jensen y Evans (21), indican que una parte de los grupos amínicos libres se encuentra en la insulina como fenilalanina; respecto de los grupos fenólicos Harrington y Neuberger (22), les dan un papel en la fisiología de la hormona; Kassel y Brandt determinaron un 0,7% de metionina en la molécula hormonal (23).

Se ha confirmado que el grupo activo de la insulina corresponde a la unión S-S de la cistina, si a este grupo S-S por reductores se separa en —SH, y HS— se inactiva rápidamente la insulina (24).

La molécula de la hormona elaborada por las células BETA del islote de Langerhans (25), (26), (27), es sumamente compleja; por lo tanto, para estimarla se hace necesario confirmar experimentalmente su acción biológica, con ella o sea la acción hipoglicémica, se ha podido mediarla bajo la forma de unidades y más o menos universalizar su determinación en un líquido, pero hasta la fecha no se ha contado con un medio para encontrarla químicamente; nosotros en esta nota damos idea de un método químico para su determinación en el tubo de ensayo o por reacción microquímica en el bioplasma de los elementos que la elaboran en el páncreas (28).

MATERIAL Y METODOS

Atendiendo a que hasta julio del presente año publicamos una nota (28), respecto a la dosificación y reconocimiento químico de la insulina y que fue la culminación de una serie de trabajos emprendidos por mí en el Laboratorio de Biología de la Universidad de Puebla, que fueron realizados por sugerencia que me hizo mi estimado amigo el Dr. R. Carrasco-Formiguera, no se sabía reconocer químicamente la insulina, hoy amplió dicha nota que publicamos en julio del presente, puesto que, en el N° 7 del volumen 2 de Sinop. Méd. Inter. de octubre 1953, y en la pág. 7, se lee:

"En ausencia de un criterio químico suficientemente preciso, la insulina fabricada en los diversos países se dosifica recurriendo a su poder hipoglicemiante en diversos animales de laboratorio".

Los fisiólogos se ven en la necesidad para estandarizar la insulina, de recurrir a la determinación de la unidad hipoglicemiante que sea universal, aun cuando en realidad sea empírica por basarse en un fenómeno biológico indirecto de la insulina y no en la naturaleza química de su molécula; hoy, con la aplicación del reactivo que propongo en ésta nueva nota, se unificará el criterio pues se encontrará basado en la determinación química de la molécula de dicha hormona; solamente para aclarar lo anterior transcribo el criterio de los fisiólogos y clínicos, en relación a la unidad insulínica conocida en el año de 1935, y la variación que sufrió dicha unidad en 1952.

En 1935 el patrón UNIDAD DE INSULINA se definía como: "la actividad específica contenida en la 22a. parte de 1 mg. del nuevo preparado de insulina cristalizada".

En el año 1952, la UNIDAD DE INSULINA se definía: "La unidad internacional de insulina es la actividad contenida en 0,04082 del tercer preparado patrón internacional".

Esta variación en el criterio de unidad de insulina se debía a la falta de recurso químico para su determinación.

La molécula de la hormona es muy compleja, pero tiene en su edificio ácidos aminados azufrados que no son comunes, y a los que, como dije, se les debe la acción tan característica de la hormona (24); con este criterio se emprendieron los trabajos para el reconocimiento de la cistina, cisteína y metionina, elementos característicos de la molécula y determinantes de su papel biológico.

Teníamos ante nosotros dos caminos: en el primero, buscarlos por sus reacciones de coloración; en el segundo, tratar de precipitarlos, para reconocerlos fácilmente; en el primer caso fue necesario estudiar no solamente reactivos para determinar sus reacciones de coloración, sino que necesitamos estudiar un líquido fijador histológico para precipitar la misma insulina en su punto isoeléctrico y de esa manera tener fácilmente la respuesta en reacciones de coloración de sus ácidos aminados que la caracterizaban (29).

En el segundo caso, o sea buscar las reacciones necesarias para precipitar todo el azufre de la insulina como medio para demostrarla, fue mucho más fácil y claro; para ello, lo hicimos hidrolizando la hormona, el líquido orgánico en que se sospeche contenga insulina o bien los cortes histológicos, con una solución de sosa al 0,31% y después de ½ minuto se añadió solución de cianuro de mercurio al 3% durante 3 horas, pudiendo acortar la duración del proceso si se hace la investigación a calor.

Si se verifica a los 100° es casi instantánea si la temperatura es menor, el tiempo empleado es mayor; a la temperatura de laboratorio de 18°-19° la duración de la reacción es de 3 horas; de esta manera podemos manejar el proceso de acuerdo con las necesidades de la investigación, pues es muy distinto trabajar en el tubo de ensayo o sobre el corte histológico tan delicado en su manipulación pues su naturaleza celular hace que no se le deba tener mucho cuidado para no alterar su estructura. Podemos ver las relaciones de tiempo y temperatura en la curva determinada en la figura número 7.

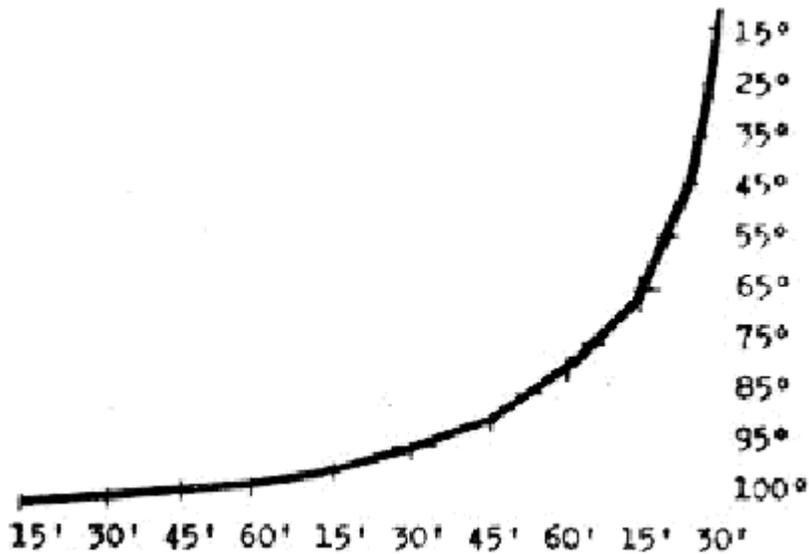


Figura 7. Curva que nos indica el tiempo necesario para determinada temperatura en la que se precipita el azufre de la insulina, bajo la forma de cianuro de mercurio.

En dicha reacción se precipita el azufre con el reactivo como cianuro de mercurio negro y se aprecia dicho precipitado como partículas negras, observables al microscopio en el corte histológico, o en el tubo de ensayo en cuyo fondo lo podemos ver, o bien al colorímetro por hacer turbio al líquido que lo contiene.

DISCUSION

Anteriormente se dijo, que en la molécula de la hormona entran 3 clases de aminoácidos azufrados: la cistina, la cisteína y por último la metionina; estos elementos no se encuentran muy repartidos en el organismo animal, el órgano que los contiene en grandes cantidades es el páncreas y en él se localizan en su hormona la insulina; si nosotros hacemos que se les precipite su azufre, reconoceremos de esta manera a la insulina, pues la que lleva los tres aminoácidos es ella.

Y de esa sencilla manera precipitaremos por el cianuro de mercurio al azufre de la hormona bajo la forma de sulfuro de mercurio negro muy demostrable al microscopio o al colorímetro, confirmando que mientras más sea el precipitado, mayor será la cantidad de insulina encontrada. En el organismo se encuentra un tripéptido, el glutatión, que juega un papel muy grande en las óxidorreducciones orgánicas; este tripéptido se encuentra formado de ácido glutámico, glicocola y cisteína. Por lo mismo, puede dar la reacción de la insulina, pues tiene uno de los elementos de ella; el glutatión se encuentra en los glóbulos rojos de la sangre, en el hígado, en las suprarrenales, y en todos esos órganos de amplia función óxidorreductora, localizándose en el condrioma de los elementos celulares; este tripéptido se le puede demostrar igualmente por reacción histoquímica (30).

Si nosotros buscamos a la insulina por intermedio de la precipitación del azufre que estructura a la cistina-cisteína y metionina, en el lugar donde se elabora que es el protoplasma celular de los elementos beta del islote pancreático, o sea el islote de Langerhans de los mamíferos superiores (25), (26) y (27); o bien en los cordones intercalares del páncreas del feto de vaca, o bien tratamos de buscarla en los peces Teleósteos, por investigación histoquímica, necesitamos hacer la fijación histológica con un reactivo con el que se verifique la precipitación de que se ha hablado y al mismo tiempo se fije el preparado, lo que se consigue con el siguiente líquido:

Agua destilada100 c.c.
 Formaldehído 25 c.c. a 40 vol.
 Cianuro de mercurio3 gr.

Con este fijador se precipitará el azufre de la insulina y se hará la fijación del trozo o de las partes de órgano que se trate de investigar; se tendrá en el líquido fijador el trozo de órgano durante 48 horas, siendo el fragmento de órgano un cubo de 5 milímetros por lado, para que la fijación y la precipitación se realice en todo su espesor; después del tiempo fijado, se hará un lavado rápido en agua destilada y se harán cortes a la congelación de un grueso de 20 micras, tiñéndolos con hematoxilina de Mayer, para tener más contraste se puede virar la coloración del corte dada por la hematoxilina, al azul fuerte por la acción del carbonato de sodio al 1-2%, para precisar la acción del reactivo recogeremos un corte y los llevaremos al microscopio para ver sin el teñido a la precipitación negra (28). En la figura 8 vemos esta precipitación negra es un islote de Langerhans de páncreas de perro; en la lámina I el mismo islote teñido con hematoxilina virada la coloración con solución de carbonato de sodio; por último, en la lámina II, tenemos las precipitaciones en los cordones intercalares de un corte de páncreas de feto de vaca.

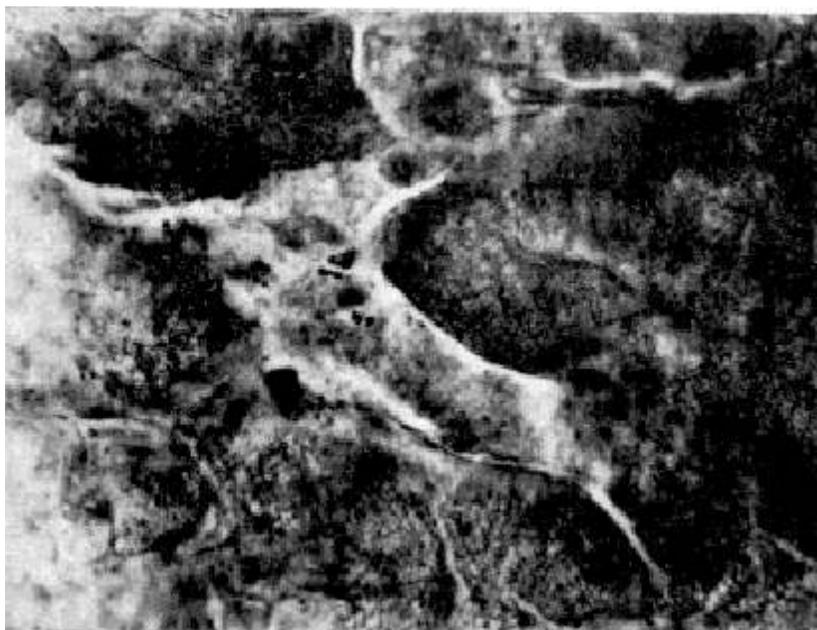


Fig. 8. Fotomicrografía de un corte de páncreas de perro fijado con el líquido propuesto, y en el que se ven las precipitaciones de sulfuro de mercurio.

CONCLUSION

Por lo tanto, el cianuro de mercurio precipita al azufre que estructura a los ácidos aminados integrantes de la molécula de insulina, elaborada en el protoplasma de las células BETA del islote de Langerhans pancreático; ésta precipitación se puede efectuar en el tubo de ensayo para el reconocimiento de la hormona pancreática, o por intermedio del colorímetro para determinar la cantidad de unidades insulínicas contenidas en un líquido; por lo mismo nos ayuda en la investigación CUALITATIVA y CUANTITATIVA de la insulina; por último nos da la imagen de la investigación histoquímica de esa hormona en el hialoplasma de los elementos celulares productores de ella (25), (26), (27), (28), (29).

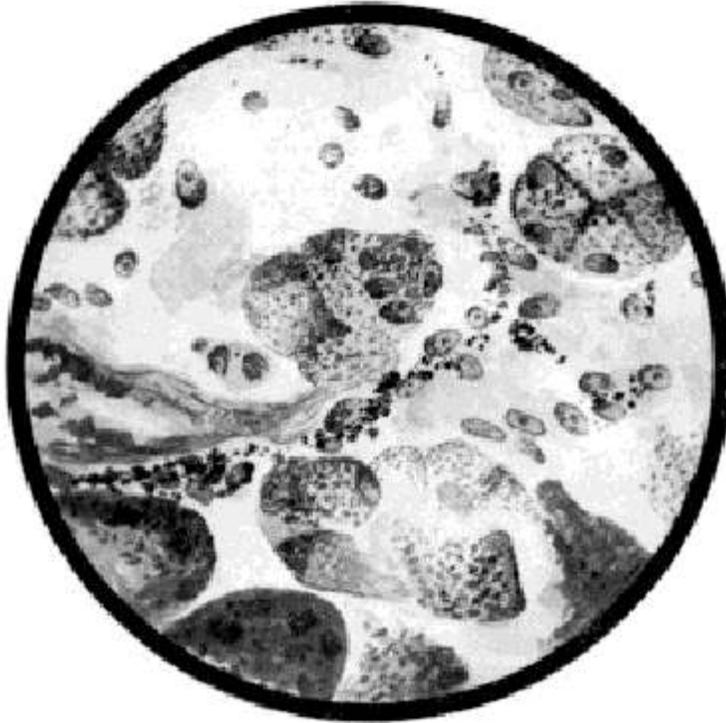
SUMARIO

Se estudia, en esta nota, la molécula de la hormona pancreática, la INSULINA, así como su determinación química; para esto último se da cuenta del reactivo que la demuestra, tanto en el tubo de ensayo, como en el

interior del bioplasma de los elementos BETA del islote de Langerhans.

Como la investigación de la insulina puede efectuarse en cualquier líquido orgánico, y dicha determinación permite conocer hasta la cantidad de unidades insulínicas por centímetro cúbico del líquido, creemos que sea de utilidad hasta para la determinación precisa de la llamada UNIDAD de insulina; por otra parte, como se anota, permite encontrar a la hormona en su centro de elaboración haciéndola apreciable por reacción histoquímica de precipitación.

LAMINA II



Dibujo tomado a la Cámara Clara, de un corte de 20 micras de páncreas de feto de ternera, fijado en el líquido propuesto en esta nota para el descubrimiento de la INSULINA en los elementos generadores de ella.

En este corte se observan, los acinis de la glándula, y en los corredores intercalares las precipitaciones de sulfuro de mercurio debidas a los ácidos amínicos sulfurados descompuesto por el cianuro metálico del fijador, y característicos de la insulina.

BIBLIOGRAFÍA

1. ASTBURY ET BELL, Tab. Biol., 1939, 17(I), 90.
2. AMORÓS, J. L. Tec. del Anal. Cris. Quím., Madrid 1952.
3. BUNN. Chemical Crystallography, Oxford, 1945.
4. BRASSEUR. Les Rayons X et leurs Aplications. Liège, 1945.
5. GUINIER. Radiocristallographie, Paris, 1945.
6. CROWFOOT. Nature, 1935, 135-591.

7. — Nature, 1937, 140-149.
8. — Proc. Roy. Soc. A., 1938, 164-580.
9. — et RILEY. Nature, 1939, 144- 1011.
10. CROWFOOT. Chem. Rev, 1941, 28-215.
11. SVEDBERG. Proc. Roy. Soc., B., 1939, 127, I.
12. MILLER et ANDERSON, J. Biol. Chem., 1942, 144-475.
13. CHIBNALL. Proc. Roy. Soc. B., 1942, 131-136.
14. COHN ET EDSALL. Proteins. Amino-acids and Peptides, New York, 1943, pág. 318 (Edsall) .
15. FANKUCHEN. J. Gen. Physiol., 1940-1941, 24-315.
16. DUDLEY. Bioch. Jour., 1923, 376-17.
17. ABEL y GEILING. Journ. of pharmacol. and Exp. Therap., 1925, 25, N° 6.
18. DU VIGNEAUD, JENSEN y WINTERSTEINER. Jour Pharm. Exp. Terap., 1928. 32-367.
19. MILLER E. J. Bioch. Jour., 1935, 29:2344.
20. FLORENCE G. La Therap. Moder., I tomo, 1930.
21. JENSEN. Jour. Biol. Chem., 1937, 97-93
22. NEUBERGER. Bioch. Jour., 1938, 32-1452.
23. KASSEL y BRAND. Proceed. Soc. Exp. Biol. and Med., 1937.
24. MARGARIA. Chimica e fisico-chimica fisiologica. 1936, 357. (Edit. Ulrico Hoepli, Milano.)
25. SUÁREZ SOTO, V. Bol. Biol., Univ. de Pueb., N° 6, 21-28, 1943.
26. — Bol. Biol., Univ. de Pueb., N° 7-8, pág. 51-60, 1944.
27. — Bol. Biol., Univ. de Pueb., N° 9-10, 46-50, 1944.
28. — Rev. de Biol., Inst. Nor. del Edo. N° 1, 7-20, 1953.
29. — Bol. Med. del IMSS en Puebla, N° 2-3, pág. 30-34, tomo I.
30. JOYET-LAVERGNE, Compt. rend. de la Soc. de Biol., 98. 1928.