

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Insulina en el atún, *Thunnus thynnus*, L.*

J. Planas Mestres **

(Recibido para publicar el 17 de octubre de 1955)

La extracción industrial de insulina de peces para su empleo en la clínica humana ha tenido y tiene especial importancia en el Japón, donde un 70 % de la producción de insulina corresponde a este origen. Con esta orientación el Instituto de Investigaciones Pesqueras sugirió el interés de investigar las posibilidades que a este respecto ofreciera la pesca nacional.

La especie escogida para este primer estudio ha sido el atún de las costas españolas *Thunnus thynnus*, L. Otras especies de la familia de los *Thunnidae* habían sido investigadas por otros autores [TOHYAMA y col. (29); NAGASAWA y KONDO (21)].

La morfología del páncreas de los peces ofrece una gran variabilidad. Puede hacerse una distinción clara entre el páncreas de los Seláceos y de los Teleósteos, ocupando los Ganoideos una posición intermedia.

Los Seláceos presentan el páncreas como una glándula compacta, bilobada, cuyo parecido con el páncreas de los Mamíferos es evidente, no solamente por su aspecto morfológico, sino también por la presencia de islotes de Langerhans diseminados en su masa [DIAMARE (7); JACKSON (12); MCCORMICK (18)].

En los Teleósteos, el páncreas exocrino se halla, generalmente, diseminado, esparcido por los mesenterios a lo largo del tubo digestivo y acompañando en su curso a los vasos viscerales, con lo que pueden ser invadidas ciertas vísceras, como

* La parte experimental de este trabajo corresponde a la tesis doctoral leída en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona, en noviembre de 1955.

** Con una beca del Instituto de Investigaciones Pesqueras.

el hígado [CASTALDI (5); MAXIA (17); BÎMES (1)], el bazo [MAXIA (17); LEPORI (13)], etc. Por el contrario, el tejido pancreático endocrino se encuentra reunido formando unos nódulos, visibles macroscópicamente, ya citados de antiguo [BROCKMANN (4); STANNIUS (25)], y homologados con los islotes de Langerhans de los Vertebrados superiores por DIAMARE (6) y RENNIE (23).

Años más tarde, MACLEOD (15) demostró que la formación de insulina se hacía exclusivamente por el tejido insular gracias a sus experiencias con nódulos pancreáticos endocrinos de Teleósteos.

La producción de insulina en los peces ha sido objeto de numerosos trabajos (8, 18, 19, 20, 21, 22, 27, 29, 31, 32). La insulina obtenida poseía las mismas características fisiológicas que la de los Mamíferos, y las pruebas clínicas demostraron que su uso en el hombre es completamente satisfactorio.

En este trabajo se han localizado los nódulos pancreáticos endocrinos del atún *Thunnus thynnus*, L., se ha valorado su riqueza en insulina y ha sido hecho su estudio histológico.

Material y métodos

El material está constituido por los nódulos pancreáticos endocrinos, localizados por nosotros en el atún *Thunnus thynnus*, L., en ejemplares pescados en la almadraba de Cap de Terme (Tarragona) durante las temporadas de 1953 y 1954.

En quella zona, los ejemplares que corrientemente se capturan tienen una longitud de 80 a 130 cm. y un peso comprendido entre 10 y 30 kg., aunque en los meses de agosto, septiembre y octubre es frecuente que se pesquen ejemplares de mayor talla (50 a 70 kg.).

Todo el material recogido corresponde a atunes llamados en su migración «de revés» o «de retorno», puesto que regresan de su lugar de puesta.

La extirpación de los nódulos endocrinos se realizó en la propia embarcación, inmediatamente después de la muerte de los peces, dejando los islotes en un líquido conservador (solución saturada de ácido pícrico).

La extracción de la insulina se ha realizado según el método de DUDLEY (8), precipitando la insulina como picrato, disolución posterior en acetona acuosa, separación de ésta por evaporación a vacío y formación de clorhidrato de insulina en solución alcohol-ácido clorhídrico, que se precipita y lava con acetona. El material de partida ha oscilado entre 5 g. y 5'5 g.

de nódulos en cada extracto y el clorhidrato de insulina obtenido ha sido disuelto en 50 c. c. de agua bidestilada y estéril, añadiendo nipagín (1 % concentración final) como conservador. Las soluciones de los extractos se han mantenido en la nevera.

Hemos observado que el poder conservador de la solución de ácido pícrico permite que, sin necesidad de mantener baja la temperatura, se disponga de suficiente margen de tiempo hasta llevar a cabo la extracción en el laboratorio.

La valoración de los extractos se ha hecho por el método de MARKS (16), determinando las glucemias de los conejos por el método de SOLS (24), tomando una muestra de sangre cada hora durante cinco horas después de la inyección o sólo a la hora y media, a las tres horas y a las cinco horas, como indica TOHYAMA y colabs. (29). Los efectos obtenidos con los extractos han sido comparados con los producidos por una muestra standard de Insulina NOVO.

Para el estudio histológico, los nódulos han sido fijados en los líquidos de ZENKER, HELLY y BOUIN, indicados por varios autores (2, 3, 11, 13, 28) para el estudio de los islotes de Langerhans. La inclusión de los bloques se ha realizado en parafina, practicándose los cortes a 5 micras de espesor. En la colocación de los cortes han sido seguidas las siguientes técnicas, recomendadas por los autores que se citan: Hematoxilina-Eosina (3, 11, 13); Método de Mann (30); Método Azan de Heidenhein (2, 11, 28); Hematoxilina férrica (2); Método de Mallory (13); Método de Gomori (9); Eosina-Azul de metileno (3).

Resultados

i. ESTUDIO ANATÓMICO.

Ha sido llevado a cabo un estudio sobre la anatomía visceral del atún, dando como resultado la localización de varios nódulos pancreáticos endocrinos.

En la bibliografía que hemos tenido ocasión de consultar, no hemos encontrado ninguna referencia sobre la localización de los nódulos endocrinos en *Thunnus thynnus*, L. Sin embargo, teníamos datos sobre especies de la misma familia (TOHYAMA y colabs. (29), aunque muy generales y ambiguos.

En el atún como en la mayoría de especies estudiadas, los islotes no son visibles cuando las vísceras están «in situ». Los nódulos endocrinos se encuentran en el hígado, en su cara interna, y para su observación es necesario levantar el lóbulo hepático correspondiente.

En el atún, el hígado se halla formado por tres lóbulos : uno central, de mayor tamaño, que tiene posición ventral y es el único visible «in situ», y dos lóbulos laterales, más pequeños y de tamaño parecido entre sí. La cara externa de los lóbulos presenta una fina estriación radial, violácea, y por su cara interna presentan unos plexos sanguíneos o conos vasculares [GODSIL (10)] que constituyen comunicaciones sanguí-

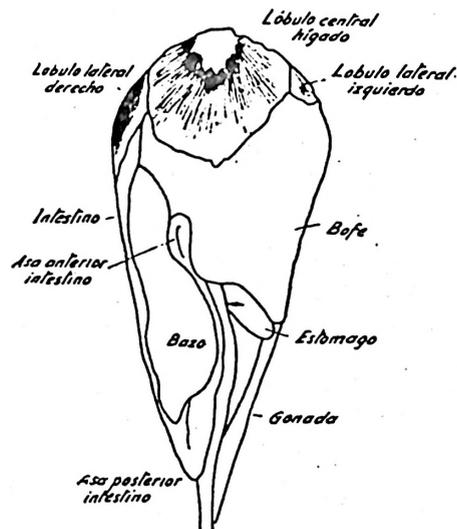


Fig. 1. — Vísceras, vista ventral.

neas de dichos lóbulos con las distintas vísceras. En la localización de los nódulos pancreáticos endocrinos es de gran utilidad el conocimiento de los detalles anatómicos del hígado para poder referir sus respectivas posiciones.

El lóbulo hepático central presenta en su cara interna un grueso cono vascular que comunica a dicha víscera con la masa cecal o bofe, y también con el duodeno. En el extremo de dicho cono, próximo al duodeno y adherido al conducto biliar, hemos encontrado un nódulo que designamos por A_1 . Su forma es más o menos redonda, su tamaño es de 5 a 8 mm. y presenta un color rosado, común en este tejido endocrino. Hemos localizado igualmente en dicho cono otros nódulos endocrinos (A_2 , A_3 , A_4 , A_5) de tamaño inferior (de 1 a 3 mm.) y de presencia y posición variables.

El lóbulo lateral derecho presenta dos conos vasculares que comunican uno con el estómago y el otro con el bofe, para seguir luego hasta el bazo. En la base de este segundo cono

hemos encontrado el islote de mayor tamaño (1 cm. de diámetro) y de forma generalmente oval, que designamos por B₁. Pegados al mismo cono vascular hemos localizado dos islotes de tamaño muy inferior (1 a 1'5 mm.).

Por el contrario, en el lóbulo lateral izquierdo no hemos podido apreciar la existencia de nódulos endocrinos. Dicho lóbulo presenta cinco conos vasculares, cuatro de los cuales comunican con el bife y el otro, mayor, con el estómago por su pared dorsal.

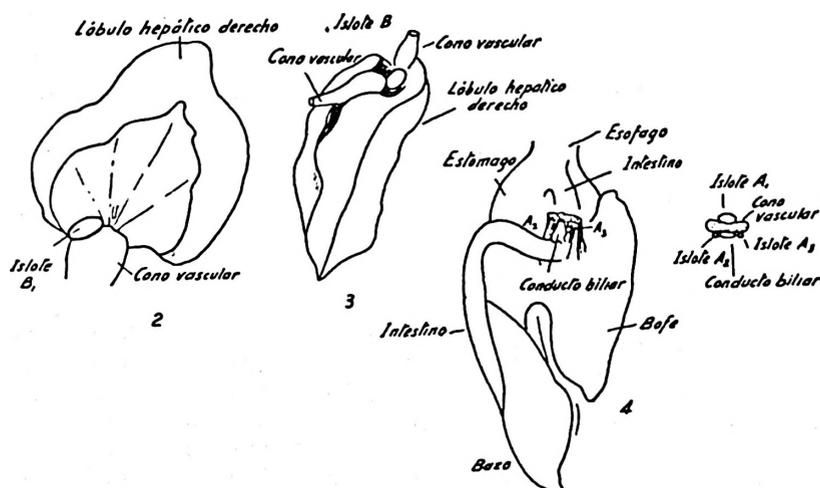


Fig. 2. — Islote B, después de reversión total del lóbulo hepático lateral derecho.

Fig. 3. — Posición del islote B, entre los conos vasculares.

Fig. 4. — Nódulos A después de extirpar el lóbulo hepático central. A la derecha, detalle de la posición de A₁, A₂ y A₃, en relación con el conducto biliar y cono vascular.

En la extirpación de los nódulos a fin de obtención de insulina, hemos prestado solamente atención a los islotes B₁ y A₁, y en ciertos ejemplares también el A₂. Esta operación no presenta ninguna dificultad, puesto que los nódulos son bien perceptibles por su color rosado y por constituir un pequeño abultamiento en la superficie del cono en que se encuentra. Sin embargo, el islote B₁ es más difícil su localización por hallarse englobado generalmente en la base del cono vascular. Las figuras 2, 3 y 4 muestran la posición de los nódulos más importantes.

2. ESTUDIO FISIOLÓGICO

La verdadera naturaleza endocrina de los nódulos pancreáticos localizados en el atún ha sido puesta de manifiesto gracias

a los extractos obtenidos con el método de DUDLEY (8), que han permitido apreciar su acción hipoglucemiante y valorar su actividad insulínica.

En los dos primeros extractos se han llevado a cabo experiencias de tanteo a fin de determinar la dosis mínima más adecuada para aplicar la técnica de valoración de MARKS (16).

En el cuadro I quedan expuestos los resultados de la valoración biológica de los extractos, realizada con lotes de distintos conejos y con diferente número de animales en cada uno.

CUADRO I

Valoración de los extractos de nódulos pancreáticos endocrinos del atún, según el método de Marks.

Extracto	Peso del material de partida	Suma porcentajes reducción		Unidades 0,03 cc.	Unidades 50 cc.	Rendimiento U. I./g.
		Standard (Insulina 0,1 U. I. a kg.)	Extracto (0,03 cc. a kg.)			
N.º 3	5'5 g.	104'09	171'60	0'650 U. I.	1.083 U. I.	196 U. I./g.
* N.º 3	5'5 »	73'0	86'8	0'475 »	791 »	143 »
N.º 9	5 »	246'7	248'3	0'402 »	670 »	134 »
N.º 10	5 »	246'7	207'2	0'335 »	558 »	111 »
N.º 12	5'5 »	135'8	200'0	0'589 »	981 »	178 »
N.º 13	5'5 »	135'8	157'1	0'462 »	770 »	140 »
			0,05cc./2 kg.	U 1./0,05 cc.		
N.º 5	5'5 »	63'4	79'5	0'501 U. I.	501 »	91 »
N.º 6	5'5 »	111'4	167'0	0'599 »	599 »	109 »
N.º 7	5'5 »	135'8	181'9	0'535 »	535 »	97 »

* Nueva valoración del mismo extracto al año de realizarse la primera.

Los extractos números 5, 6 y 7 se han efectuado con islotes endocrinos que han permanecido ocho meses en la solución conservadora de ácido pícrico. Los del extracto número 6 se habían mantenido en la nevera (5° C). Los 5 y 7 se habían dejado a temperatura ambiente.

El cuadro II da la relación de unidades de insulina por mg. de peso del producto obtenido en tres de los extractos para dar idea de su pureza.

3. ESTUDIO HISTOLÓGICO.

En la mayoría de las preparaciones histológicas que han sido observadas hemos podido apreciar que los nódulos endo-

crinos se hallan rodeados por una envuelta conjuntiva que, desde McCORMICK (18), se denomina «cápsula conjuntiva». Externo a dicha cápsula aparece frecuentemente parénquima hepático o la estructura característica de los conos vasculares; así como es frecuente la presencia de tejido adiposo.

En su interior, el nódulo está formado, en su mayor parte, por tejido endocrino, pero se halla surcado por abundantes trabéculas de tejido conjuntivo, cuyo número y disposición es variable. Es frecuente que, acompañando a estas fibras conjuntivas, penetren también dentro del nódulo células del tejido exocrino, aunque esta invasión es siempre muy limitada. En general, los elementos exocrinos se disponen dentro del nódulo, en cordones, pegados o englobados en las trabéculas de tejido conjuntivo, no pudiéndose observar en contacto directo con las células endocrinas.

CUADRO II

Relación entre la insulina valorada y el peso de clorhidrato obtenido en tres extractos.

Extracto	Clorhidrato insulina (bruto) obtenido	Cantidad insulina valorada	Relación
N.º 3	173 mg.	1.083 unidades	1 mgr. — 6'2 unidades
N.º 10	108'5 »	558 »	1 mgr. — 5'1 unidades
N.º 12	122 »	981 »	1 mgr. — 8 unidades

Las células endocrinas ocupan, materialmente, casi todo el espacio comprendido dentro de la cápsula conjuntiva y con los métodos de tinción empleados ha sido claramente perceptible la diferenciación de unas zonas o grupos de células más oscuras, en medio de zonas de células más claras, en idéntica forma como ha sido descrito por LEPORI (13, 14).

En las zonas oscuras han sido identificadas las células α descritas por BOWIE (3), mientras que las zonas claras están formadas por el tipo β , también citado por dicho autor.

Las células α presentan una forma oval, muchas veces piriforme; la membrana nuclear es bien patente, con gruesos granos de cromatina en disposición típica. Su protoplasma se halla ocupado por finos gránulos, densamente distribuidos por toda la célula.

Las células β son de forma poliédrica y tamaño algo superior al de las α . El núcleo es menos patente con una membrana más delgada y los granos de cromatina finamente divididos.

Los gránulos citoplasmáticos son mayores y mucho menos abundantes que en las células α .

Dentro del núcleo pancreático endocrino, las células α se extienden por él, alternando con los grupos de células β , siendo, quizá, en la periferia, en contacto con la capa conjuntiva, donde son más abundantes estas últimas. Sin embargo, no parece tan evidente en el atún la disposición central de las células α como cita BOWIE (3) en *Neomænis griseus*.

Ha sido observado cómo las células α son especialmente frecuentes a lo largo de los capilares sanguíneos, adoptando una disposición en roseta, característica en muchos peces [BOWIE (3); LEPORI (13)].

Las células del tipo γ no han podido ser señaladas, aunque para negar su existencia sería necesario un examen más detenido, que sale fuera de nuestro plan de trabajo.

Discusión

La riqueza insulínica de los distintos extractos presenta una gran variabilidad que depende de la forma más o menos exhaustiva de la aplicación del método de extracción.

Los rendimientos que hemos obtenido oscilan entre 140 y 196 unidades por gramo de tejido fresco, que concuerdan con los valores hallados para otras especies de la misma familia *Thunnidæ* [TOHYAMA y col. (29); NAGASAWA y KONDO (21)].

El tiempo de conservación de los nódulos endocrinos en la solución saturada de ácido pícrico, dentro de ciertos límites, no ha tenido ninguna influencia sobre la riqueza insulínica de los extractos. Así, los nódulos utilizados en los extractos números 9 y 10 son los que han permanecido menor tiempo (10 a 12 días), mientras que los usados en el extracto número 3 llevaban ya unos 20 días y los correspondientes al extracto número 12 oscilaban entre 15 y 35 días. Sin embargo, la permanencia de mayor tiempo (8 meses) en la solución saturada de ácido pícrico supone una pérdida muy marcada en el contenido insulínico del material, como ha podido ser observado en los extractos números 5, 6 y 7.

La temperatura ha tenido escasa influencia en la conservación de la insulina, pero afecta al aspecto y consistencia de los nódulos endocrinos, pues los mantenidos en la nevera presentan su aspecto externo y la elasticidad de sus tejidos que le es propia. La diferencia entre ambos lotes de nódulos es evidente morfológicamente, pero los rendimientos obtenidos son del mismo orden, que referidos al extracto número 3, represen-

tan un 44 % de pérdidas para el extracto número 6 y un 52 % para la media de los extractos números 5 y 7.

Sin embargo, debe reconocerse el alto poder conservador de la solución saturada de ácido pícrico, así como una resistencia propia de los nódulos, también observada en especie afín [TACHINO, (26)].

La estabilidad de las soluciones de clorhidrato de insulina es bastante pequeña, pues aún con la adición de un antiséptico (nipagín) experimenta pérdidas de un 27 % en un período de un año, como hemos apreciado en el extracto número 3.

La pureza del clorhidrato de insulina obtenido con los nódulos pancreáticos del atún es más elevada que la alcanzada por DUDLEY (8) en el bacalao, donde señala una riqueza de 1 unidad por 0'5 a 1 mg. de clorhidrato. Los valores hallados por nosotros pueden verse en el cuadro II, y suponen de 5 a 8 unidades por 1 mg. de clorhidrato de insulina.

El aprovechamiento industrial de la insulina del atún como un subproducto de su pesca puede presentar cierto interés. Hemos calculado de forma sólo aproximada la relación existente entre el peso de los nódulos y el peso del pez, que referida sólo a los islotes B₁ y A₁, resulta ser del orden de 0'01 por 1.000. Según este valor y teniendo en cuenta las estadísticas de pesca del atún en España en estos últimos años, podrían obtenerse anualmente unos 50 kg. de nódulos endocrinos, de los cuales podrían extraerse cerca de 10 millones de unidades de insulina.

Resumen

Se han localizado varios nódulos pancreáticos endocrinos en la cara interna del hígado del atún; de los cuales, el mayor se encuentra situado en el lóbulo lateral derecho del hígado.

Se ha estudiado la acción hipoglucemiante de los extractos de nódulos pancreáticos, por inyección en conejos, previo ayuno de veinticuatro horas. El efecto insulínico ha sido comparado con una muestra «standard» de Insulina NOVO. Los rendimientos más altos conseguidos oscilan entre 140 y 196 unidades internacionales por gramo de tejido endocrino.

Se ha comprobado que la pérdida en insulina que experimentan los nódulos sumergidos en solución saturada de ácido pícrico es de un 50 % a los ocho meses y que la temperatura de conservación tiene escasa importancia.

Se ha comprobado, igualmente, que la insulina en solución y en presencia de nipagín pierde un 27 % de su actividad en el período de un año.

Histológicamente, se ha podido identificar en los nódulos pancreáticos endocrinos a las células α y β como los componentes principales de los mismos.

Se discute la posibilidad de utilización de los nódulos pancreáticos del atún como materia prima para la preparación industrial de insulina.

Summary

Various endocrine pancreatic nodules have been localised on the internal surface of the liver of the tunny-fish; of which the greatest is found in the right lateral lobe of the liver.

The hypoglycemia-producing action of the extracts of pancreatic nodules has been studied by injection in rabbits fasting for 24 hours. The insulin-like effect has been compared with a standard sample of NOVO insulin. The highest results obtained vary between 140 and 196 international units per gram of endocrine tissue.

It has been proved that the loss of insulin by nodules submerged in saturated solution of picric acid is 50 % at the end of 8 months, and that the temperature of conservation is of little importance.

It has also been proved that insulin in solution and in the presence of nipagin loses 27 % of its activity in one year.

Histologically, it has been possible to identify the cells α y β , in the endocrine pancreatic nodules as their principal components.

The possibility of the use of pancreatic nodules of the tunny-fish as prime material in the industrial preparation of insulin is discussed.

Bibliografía

- (1) BÎMES, C. : *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*; **81**, 7, 1946.
- (2) BLOOM, W. : *Anat. Rec.*; **49**, 363, 1931.
- (3) BOWIE, J. : *Univ. Toronto, Studies, Physiol.*; Series, n.º 87, 1925.
- (4) BROCKMANN, H. : *Juang. Disert.*; Rostochii, 1846.
- (5) CASTALDI, R. : *C. R. Ass. Anat.*; p. 152, 1926.
- (6) DIAMARE, V. : *Intern. Mont. Anat. Phys.*; **16**, 155, 1899.
- (7) DIMARE, V. : *Intern. Mont. Anat. Phys.*; **22**, 127, 1905.
- (8) DUDLEY, H. W. : *Biochem. J.*; **18**, 665, 1924.
- (9) FERNER, H. : *Das Inselsystem des Pankreas*. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart, 1952.
- (10) GODSIL, H. C. y KOLMBERG, E. K. : State of Calif., Dep. Fish and Game, Fish Bull., n.º 77, 1950.
- (11) GROSSO, L. L. : *Zoologica*; **35**, 169, 1950.
- (12) JACKSON, S. : *J. Metab. Res.*; **2**, 141, 1922.
- (13) LEPORI, N. G. : *Atti Soc. Tosc. Sc., Nat. Mem.*; **59**, Serie B, 1952.
- (14) LEPORI, N. G. : *Arch. ital. Anat. e Embriol.*; **58**, 1, 1953.
- (15) MACLEOD, J. J. R. : *Univ. Toronto, Studies, Physiol.*; Series, n.º 55, 1923.
- (16) MARKS, H. P. : *Brit. Med. J.*; **2**, 102, 1925.
- (17) MAXIA, C. : *Scritti Biol.*; **10**, 81, 1935.
- (18) McCORMICK, N. A. : *Univ. Toronto, Studies, Physiol.*; Series, n.º 88, 1925.
- (19) McCORMICK, N. A. y NOBLE, E. C. : *J. Biol. Chem.*; **59**, 1924.
- (20) McCORMICK, N. A. y NOBLE, E. C. : *Contr. Canad. Biol.*, New Series, Vol. 2, 117, 1924.

- (21) NAGASAWA, Y. y KONDO, S. : *J. Pharm. Soc. Japan*; **62**, 287, 1942.
- (22) NOGI, K., SOEJIMA, S. y KUBO, H. : *Folia Endocrinol. Japan*; **19**, 457, 1943.
- (23) RENNIE, J. : *Quart. J. Micr. Sci.*; **48**, 379, 1905.
- (24) SOLS, A. : *Rev. esp. Fisiol.*; **5**, 149, 1949.
- (25) STANNIUS, F. H. : *Arch. Anat.*; 405, 1848.
- (26) TACHINO, A. : *Agricultura*; **2**, 35, 1948.
- (27) TATENO, S. : *Nógaku*; **2**, 115, 1948.
- (28) THOMAS, T. B. : *Amer. J. Anat.*; **62**, 31, 1937.
- (29) TOHYAMA Y., TETSUMOTO, S., FUYUKA, S. y YAMADA, S. : *Jap. J. Exp. Med.*; **19**, 157, 1941.
- (30) TONUTTI, E. y GROBETY, J. : 11 tg. Schweiz. Anat. ; Lausanne, 1948.
- (31) UDA, M. : *Nógaku*; **3**, 571, 1949.
- (32) ZEILE, K., BRANDES, C. H., HANSKE, M., ROEVER, W. y RITZHAUPT, H. : *Pharmazie*; **3**, 295, 1948.