



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Valor semiològic, en la diabetis no insulíndependent, de la insulina sèrica 120 minuts postingesta de glucosa

Jaume Miró Balagué



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

VALOR SEMIOLÒGIC, EN LA DIABETIS NO INSULINODEPENDENT, DE
LA INSULINA SÈRICA 120 MINUTS POSTINGESTA DE GLUCOSA.

Tesi presentada pel llicenciat
En Jaume Miró i Balagué per a
optar al grau de Doctor en Far
màcia.

Dirigida pel Dr. Javier Fuentes
Arderiu (Servei d'Anàlisis Clí-
niques de l'Hospital Creu Roja
i Servei de Bioquímica de la C.
S. Prínceps d'Espanya. L'Hospi-
talet de Llobregat).

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700086318

BARCELONA, Desembre de 1982

vull que consti el meu agraïment:

al Dr. Javier Fuentes que ha dirigit, estimulat i col.laborat en la confecció d'aquest treball amb gran sentit de responsabilitat i companyonia.

al Prof. Dr. Antonio Torralba per la seva comprensió i aportament d'una visió crítica de gran vàlua.

al Dr. Eladio Bustamante pel seu decidit recolzament.

al Dr. Juan del Castillo per les dades clíniques subministrades.

a les Stes. Rosa M^a Escolà, Isabel Compte, Conchita Sanz, Ana Barberà, Nieves Franco i Úrsula Navarro pel seu treball tècnic o administratiu.

a l'Hospital de la Creu Roja de l'Hospitalet de Llobregat, que té com a director-gerent el Dr. Joan Ballester, per haver estat el marc on va desenvolupar-se la part experimental de la tesi.

I N D E X

	<u>Pàgina</u>
1. INTRODUCCIÓ	1
2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA DE LES BASES FISIOPATOLÒGIQUES	9
2.1. BIOLOGIA MOLECULAR DE LA INSULINA	10
2.1.1. <u>Història</u>	10
2.1.1. <u>Característiques físico-químiques de la insulina</u>	11
2.1.3. <u>Biosíntesi de la insulina</u>	12
2.1.4. <u>Secreció de la insulina</u>	14
2.1.5. <u>Efectes metabòlics de la insulina</u>	15
2.1.5.1. Efectes en el teixit muscular	15
2.1.5.2. Efectes en el teixit adipós	20
2.1.5.3. Efectes en el fetge	21
2.1.6. <u>Receptors insulínics</u>	23
2.1.7. <u>Antagonistes de la insulina</u>	24
2.2. DIABETIS MELLITUS I ALTRES CATEGORIES D'INTOLERÀNCIA A LA GLUCOSA	29
2.2.1. <u>Història</u>	30
2.2.2. <u>Descripció</u>	31
2.2.3. <u>Etiologia i patogènesi de la diabetis mellitus</u>	35

2.2.3.1.	Influència dels factors genètics	35
2.2.3.2.	Influència dels factors ambientals	39
2.2.4.	<u>Història natural i curs de la diabetis mellitus</u>	40
2.2.5.	<u>Intolerància a la glucosa independent de la diabetis mellitus</u>	43
2.2.5.1.	Afeccions pancreàtiques	44
2.2.5.2.	Glucagonoma	45
2.2.5.3.	Síndrome de Cushing	45
2.2.5.4.	Acromegàlia	46
2.2.5.5.	Feocromocitoma	46
2.2.5.6.	Hipertiroïdisme	47
2.2.5.7.	"Stress"	47
2.2.5.8.	Afeccions hepàtiques	48
2.2.5.9.	Afeccions renals	48
2.2.5.10.	Dèficit de potassi	49
2.2.5.11.	Efectes secundaris medicamentosos	49
2.2.5.12.	Obesitat	50
2.2.6.	<u>Relacions entre intolerància a la glucosa i dislipèmies</u>	52
2.2.7.	<u>Classificació de la diabetis mellitus i altres categories de intolerància a la glucosa</u>	55

2.2.7.1.	Diabetis mellitus	59
2.2.7.1.1.	Tipus I: diabetis mellitus insulino- dependent	59
2.2.7.1.2.	Tipus II: diabetis mellitus no insu- linodependent	60
2.2.7.1.3.	Altres tipus de diabetis	61
2.2.7.2.	Tolerància a la glucosa alterada	63
2.2.7.3.	Diabetis gestacional	65
2.2.7.4.	Anormalitat prèvia de la tolerància a la glucosa	67
2.2.7.5.	Anormalitat potencial de la tolerància a la glucosa	70
2.3.	INVESTIGACIÓ BIOLÒGICA DE LA INTOLERÀNCIA A LA GLUCOSA	72
2.3.1.	<u>Glucosúria</u>	72
2.3.2.	<u>Cetonúria</u>	73
2.3.3.	<u>Glucèmia</u>	73
2.3.4.	<u>Prova de tolerància a la glucosa oral</u>	75
2.3.5.	<u>Altres proves per a avaluar la toleràn- cia a la glucosa</u>	85
2.3.5.1.	Prova de tolerància a la glucosa per via venosa	85

2.3.5.2.	Prova intravenosa de la tolbutamida	86
2.3.5.3.	Prova de tolerància a la cortisona- glucosa	87
2.3.6.	<u>Insulina sèrica</u>	87
2.3.7.	<u>Hemoglobina glucosilada</u>	89
3.	REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA DE L'ENZIMOIMMUNOANÀ- LISI HETEROGÈNIA	94
3.1.	INTRODUCCIÓ	95
3.2.	CLASSIFICACIÓ DE LES TÈCNiques ELISA	98
3.2.1.	<u>Proves competitives amb conjugat an- tigen-enzim</u>	98
3.2.2.	<u>Proves competitives amb conjugat anti- còs-enzim</u>	100
3.2.3.	<u>Proves no competitives intervenint-hi un sol lloc antigènic</u>	100
3.2.4.	<u>Proves no competitives intervenint-hi dos llocs antigènics</u>	101
3.2.5.	<u>Proves per a mesurar anticossos</u>	102
3.3.	CARACTERÍSTIQUES BÀSIQUES DE DISSENY	104
3.3.1.	<u>Selecció de l'enzim</u>	104

3.3.2.	<u>Acoblament d'enzims marcadors a antigens</u> <u>o anticossos</u>	106
3.3.2.1.	Enllaços Enzim-Proteïna	106
3.3.2.1.1.	Mètode del glutaraldehyd	107
3.3.2.1.2.	Mètode del periodat	108
3.3.2.1.3.	Mètode dels compostos bifuncionals	108
3.3.2.1.4.	Enllaços no covalents	109
3.3.2.2.	Enllaços Enzim-Haptè	109
3.3.2.2.1.	Mètode de l'anhídrid mixt	110
3.3.2.2.2.	Mètode de la carbodiïmida	110
3.3.2.2.3.	Mètode dels imidats bifuncionals	110
3.3.3.	<u>Immobilització d'antígens i anticossos en</u> <u>una fase sòlida</u>	111
3.3.3.1.	Unió mitjançant forces físiques	111
3.3.3.2.	Unió per enllaços covalents	112
4.	MATERIAL I MÈTODES	113
4.1.	SUBJECTES ESTUDIATS	114
4.1.1.	<u>Subjectes normals (N)</u>	114
4.1.2.	<u>Subjectes amb tolerància a la glucosa</u> <u>alterada (TGA)</u>	117

4.1.3.	<u>Subjectes amb diabetis mellitus no in-</u> <u>sulinodependent (DMNID)</u>	118
4.2.	METODOLOGIA ANALÍTICA	121
4.2.1.	<u>Determinació de glucosa en sèrum</u>	121
4.2.2.	<u>Determinació de triglicèrid en sèrum</u>	125
4.2.3.	<u>Determinació de la fracció d'hemo-</u> <u>globina glucosilada</u>	129
4.2.4.	<u>Determinació d'insulina sèrica per ra-</u> <u>dioimmunoanàlisi</u>	132
4.2.5.	<u>Determinació d'insulina per enzimoinmu-</u> <u>noanàlisi</u>	135
4.2.6.	<u>Càlcul de l'índex d'eficàcia diagnòsti-</u> <u>ca diferencial</u>	142
4.2.7.	<u>Mètodes estadístics</u>	149
4.3.	DISSENY EXPERIMENTAL	151
4.3.1.	<u>Estudi de la determinació d'insulina per</u> <u>enzimoinmuoanàlisi</u>	151
4.3.1.1.	Comparació de substrats cromogènics	152
4.3.1.2.	Sensibilitat analítica i linialitat	154
4.3.1.3.	Sobrecàrrega amb possibles interferents	156
4.3.1.4.	Comparació amb la radioimmunoanàlisi	157

	<u>Pàgina</u>
4.3.2. <u>Proves bioquímiques practicades</u>	158
5. RESULTATS	163
5.1. BIOQUIMICA ANALÍTICA	164
5.1.1. <u>Estudi i avaluació de l'enzimoinmuno-</u> <u>anàlisi d'insulina</u>	164
5.1.2. <u>Control de qualitat</u>	174
5.2. EXPERIMENTACIÓ BIOLÒGICA	177
5.2.1. <u>Tolerància a la glucosa</u>	177
5.2.2. <u>Resposta insulínica a la sobrecàrrega</u> <u>oral de glucosa</u>	181
5.2.3. <u>Avaluació conjunta de les concentracions</u> <u>sèriques de glucosa i insulina</u>	187
5.2.4. <u>Concentració de triglicèrid sèric</u>	201
5.2.5. <u>Percentatge d'hemoglobina glucosilada</u>	201
6. DISCUSSIÓ	206
7. CONCLUSIONS	229
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	233

1. INTRODUCCIÓ

L'any 1.960 Yalow i Berson obriren una nova època en la bioquímica clínica al descriure que havien determinat la insulina sèrica per un mètode radioimmunològic (Yalow; 1.960). No obstant això, el motiu de la gran transcendència que tingué la comunicació no rau en la possibilitat de determinar el paràmetre en qüestió, sinó en la metodologia emprada. En efecte, mentre que la radioimmunoanàlisi ha estat durant dues dècades la "vedette" tecnològica dels laboratoris de química clínica, la determinació de la insulinèmia ha ocupat un lloc molt secundari en l'exploració biològica de la diabetis mellitus, reservant-se el seu ús preferentment per a la diagnosi d'insulinomes, entitat nosològica poc freqüent.

El desenrotllament d'una metodologia per a efectuar anàlisis enzimoinmunològiques (Engvall, 1.971), va encetar una important via al possibilitar que la gran majoria de laboratoris, que òbviament no disposaven d'instal·lacions adequades per a treballar amb materials radioactius, poguessin practicar determinacions de substàncies altament diluïdes en la mostra analitzada, com és el cas de les hormones.

L'any 1.979, arran de l'aparició del primer "kit" comercial per a la determinació d'insulina pel mètode ELISA (Enzymun-Test Insulina^R, Boehringer Mannheim), vàrem plantejar-nos a la Secció de Bioquímica Clínica de l'Hospital de la Creu Roja de l'Hospitalet de Llobregat si aquest paràmetre no podria ser d'utilitat per a simplificar una de les proves més farragoses i al mateix temps més sol·licitades, com és la prova de sobrecàrrega oral de glucosa amb cinc determinacions de glucosa sèrica. Per a avaluar quines eren aquestes possibilitats varen estudiar-se, en persones amb història clínica coneguda, els resultats de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa amb valors de glucosa i insulina sèriques cada mitja hora, fins a transcórrer dues hores des de la ingestió de glucosa (Miró i Fuentes, 1.980). Els pacients amb diabetis química és a dir amb tolerància a la glucosa alterada però sense signes clínics, donaven una resposta insulínica més elevada que la de les persones normals i que la dels pacients amb diabetis no insulíndependent manifesta. Això concordava amb el resultat de treballs previs en els que la determinació de la insulina sèrica s'havia efectuat per radioimmunoanàlisi (Ross, 1.970). Una conclusió interessant fou que a les dues hores de la ingestió de glu-

cosa era quan millor podien objectivar-se les diferències en la resposta insulínica entre els pacients amb diabetis no insulíndependent manifesta i els individus amb tolerància a la glucosa alterada sense signes clínics, i paral·lelament entre aquests i els subjectes normals. Al mateix temps, la conjunció dels valors de la glucosa i la insulina sèriques als 120 minuts de la ingestió de glucosa podia substituir eficaçment la prova de sobrecàrrega oral de glucosa amb múltiples de terminacions de glucosa sèrica, per a investigar la tolerància a la glucosa. Això no podia aplicar-se en el cas dels individus obesos, ja que encara que no tinguessin cap anomalia en el metabolisme dels carbohidrats presentaven una resposta insulínica molt superior a la normal, cosa que encaixava plenament amb les descripcions de resistència a la insulina en els obesos.

Partint d'aquelles dades va emprendre's un estudi més complet, que ha donat origen a la present tesi. Varen entrar en l'estudi 240 persones adultes, de les que hom coneixia la història clínica i s'agruparen, seguint els criteris del National Diabetes Data Group del National Institutes of Health dels Estats Units (National Diabetes Data Group, 1.979), en tres catego

ries segons presentessin diabetis no insulíndependent, tolerància a la glucosa alterada sense signes clínics o bé cap anomalia en el metabolisme dels carbohidrats. Tenint en compte que l'obesitat és una circumstància important en la diàtesi de la diabetis mellitus, els subjectes obesos van considerar-se independentment a fi i efecte de buscar una relació que els hi fos aplicable.

L'objectiu principal va ser el d'avaluar el valor semiològic, entès com el grau d'informació subministrada, de la conjunció de glucèmia i insulinèmia als 120 minuts d'una ingestió normalitzada de glucosa i comparar-lo amb el de la prova de tolerància a la glucosa oral. En el cas dels obesos també es tingueren en compte les concentracions basals d'insulina sèrica.

Paral·lelament, va aprofitar-se l'experiment per a obtenir dades que permetessin aprofundir en la naturalesa dels fets estudiats. Això va realitzar-se investigant les relacions de la insulina postingesta amb l'hemoglobina glucosilada i amb la variació de la concentració de triglicèrid sèric causada per la sobre

càrrega de glucosa.

L'hemoglobina glucosilada ha passat en poc temps a tenir un gran protagonisme entre els paràmetres d'utilitat en la diabetis mellitus, essent un bon indicador de la severitat i del control de la mateixa.

La concentració del triglicèrid sèric té un cert paral·lelisme amb la de la glucosa en el sentit de que sofreix grans oscil·lacions durant el dia en funció de les ingestes. Junt amb els àcids grassos lliures és un bon exponent de l'hemeostasi lipídica. Tenint en compte que la insulina és una hormona amb gran influència sobre el metabolisme lipídic, va creure's interessant investigar quina influència hi tenien les diferents categories d'intolerància a la glucosa estudiades.

La gran complexitat de l'etiologia i dels trastorns bioquímics i clínics que cursen en la síndrome diabètica fa que no pugui atribuir-se a un sol component hormonal la patogènesi de la malatia. No obstant això, a efectes pràctics, del present estudi sembla desprendre's que la determinació de la insulinèmia postestímul pot ser un element important per a distingir

d'una manera precoç entre una diabetis no insulíndependent (tipus II) i una intolerància a la glucosa secundària a altres trastorns, de tipus hormonal o altra mena, o bé idiopàtica.

La comprovació mitjançant estudis epidemiològics de que les persones amb intolerància a la glucosa moderada corren un risc baix d'arribar a patir diabetis clínica (Jarret, 1.978) ha modificat la tendència a considerar diabètic, ni que fos potencialment, tot individu amb alteracions de la tolerància a la glucosa. En efecte nombrosos grups de gran prestigi com els National Institutes of Health dels Estats Units, la British Diabetes Association, la Australian Diabetes Association i el European Association Group for Study of Diabetes (National Diabetes Data Group, 1.979), recomanen abstenir-se de considerar com a diabètics els subjectes amb intolerància a la glucosa moderada, degut a la poca justificació clínica o benefici mèdic que s'els aporta en front del trauma psicològic i social que ocasiona el fet de ser considerat diabètic. La determinació de la concentració d'insulina sèrica a les dues hores d'una ingestió normalitzada de glucosa pot ser una eina eficaç per a establir una frontera entre dues situa

cions que en principi podrien confondre's, però que com s'ha vist, ser a l'una o l'altra banda té prou importància.

2. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA DE LES BASES FISIOPATOLÒGIQUES.

2.1. BIOLOGIA MOLECULAR DE LA INSULINA.

En aquest capítol es tracta de què és i com actua la insulina a nivell molecular, ja que això és u-na clau indispensable per a poder entendre els tras-torns que es produeixen quan s'alteren els nivells fisiològics d'aquesta hormona.

2.1.1. Història.

L'any 1.889, von Mering i Minkowski observaren que la pancreatectomia practicada en gossos feia que aquests animals es tornessin diabètics. El coneixement dels efectes antihiperoglucèmics del pàncreas va confir-mar-se l'any 1.912 quan Knowlton i Starling mostraren l'acció de l'ajut en la captació muscular de glucosa (Knowlton, 1.912).

Cap a l'any 1.921, Banting i Best aïllaren insu-lina dels illots pancreàtics, veient-se que era la responsable de l'esmentada captació de glucosa (Banting, 1.922). Langerhans, essent encara un estudiant de medicina, havia descrit l'any 1.869 els illots pancreàtics que ara porten el seu nom.

La cristal·lització va aconseguir-la Abel (Abel 1.926), (Abel, 1.927) i Sanger va dilucidar-ne l'estructura química (Sanger, 1.955).

2.1.2. Característiques físico-químiques de la insulina.

Gràcies al treball de Sanger, sabem que la insulina és una proteïna de molècula relativament petita, formada per dues cadenes polipeptídiques, anomenades A la més curta, constituïda per vint-i-una restes aminoacídiques i B la més llarga, constituïda per trenta restes aminoacídiques (Figura 2.1). Ambdues cadenes estan lligades per dos ponts disulfur i a més a més la cadena A en té un altre d'intracatenari. Els aminoàcids inclosos entre les dues restes cistina que formen aquest pont són els que varien segons l'espècie animal.

La massa molecular relativa és de 6 000, aproximadament, presentant-se normalment en forma d'agregats d'almenys dos dímers.

El seu punt isoelèctric es troba entre un pH de 5,3 i de 5,4 en el que pràcticament és insoluble en aigua, incrementant-se però ràpidament la solubilitat amb discrets canvis de pH.

La insulina té una remarcable facilitat per a reac

cionar amb ions divalents, com ara el zenc, i proteïnes bàsiques com les protamines i les histones. Aquestes reaccions, que són reversibles, actuen modificant-ne la solubilitat.

2.1.3 Biosíntesi de la insulina.

Abans de l'any 1.967 es creia que la formació de la insulina s'acomplia mitjançant l'unió de les cadenes A i B, que haurien estat sintetitzades prèviament per separat. El descobriment de la proinsulina (Steiner, 1.967) donà lloc a una explicació diferent, basada en l'activació d'aquest precursor mitjançant l'escissió d'un polipèptid, anomenat C-pèptid (Figura 2.2).

Aquest procés és semblant al d'altres hormones i enzims que sofreixen una activació zimògena. La diferència fonamental rau en que el precursor és activat, convertint-se en insulina, abans de l'emmagatzement i secreció.

La proinsulina és molt semblant a la insulina, malgrat la seva superior massa molecular, coincidint en solubilitat, punt isoelèctric (Steiner, 1972), propietats autoassociatives (Frank, 1.968) i reactivitat amb anti-sèrum antiinsulina (Steiner, 1.969), (Rubins

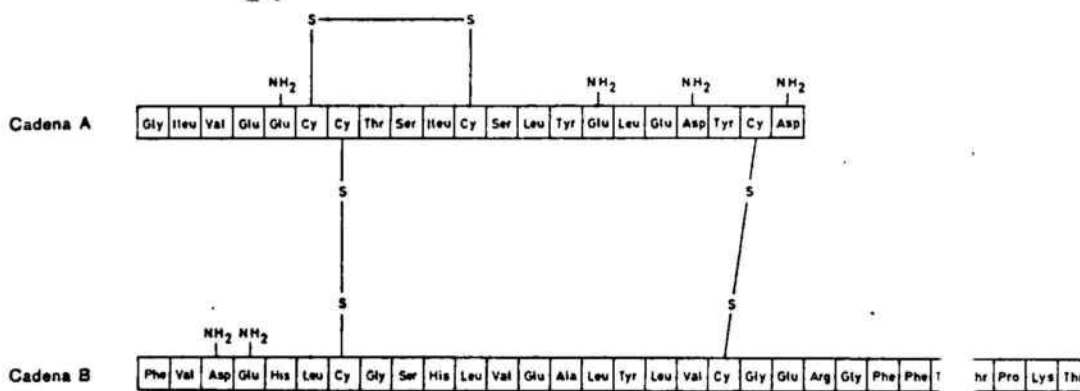


Figura 2.1. Estructura de la insulina human.

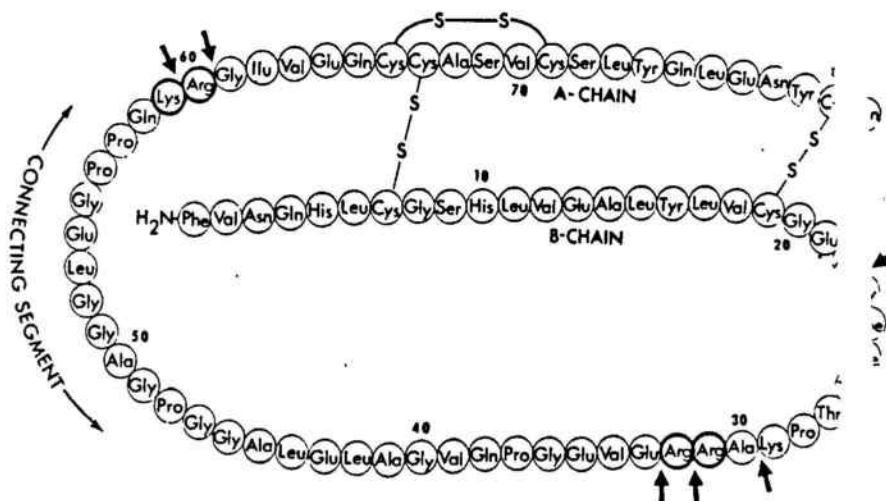


Figura 2.2. Estructura de la proinsulina. Les fletxes indiquen els llocs de ruptura triptica.

tein, 1.970). Aquesta darrera és una característica interessant, que fa que en les determinacions immunològiques d'insulina aquesta es determini conjuntament amb la proinsulina que és present al torrent sanguini, encara que normalment a baixes concentracions (Mako, 1.973).

2.1.4 Secreció de la insulina.

Les cèl.lules anomenades beta, que formen part dels illots de Langerhans al pàncreas, són les encarregades de la secreció de la insulina. Els ribosomes i el reticle endoplasmàtic rugós sintetitzen la proinsulina que posteriorment és transportada a l'aparell de Golgi, en un procés que requereix energia (Munger, 1.958). Allí es formen els grànuls beta que contenen insulina emmagatzemada. Quan els grànuls emigren cap a la perifèria llurs membranes es fonen amb la de la cèl.lula i la insulina és secretada cap a l'espai extracel.lular (Janieson, 1.967).

L'estimulació de la secreció pot ser provocada per diverses substàncies, algunes contingudes als aliments com els sucres, sobretot la glucosa i en menor escala la mannososa i la ribosa, els aminoàcids, principalment la leucina, els cossos cetònics, etcètera (Haist, 1.944). Altres són substàncies endògenes de l'organisme com les enterohormones secretina i pancreeozimina i hor-

mones procedents de glàndules de secreció interna com el glucagó, l'hormona del creixement, l'ACTH, etcètera (Floyd, 1.967).

2.1.5 Efectes metabòlics de la insulina.

Si bé l'acció de la insulina s'havia relacionat en primer lloc amb el metabolisme dels carbohidrats, als darres anys s'ha vist que el seu camp d'acció és molt més ampli, afectant el metabolisme tant de glú - cids com de lípids i pròtids. D'altra banda, el lloc d'acció abasta la gran majoria de teixits i òrgans, malgrat que la majoria de les accions més característiques es manifestin als músculs, teixit adipós i fetge (Quadre 2.I-).

2.1.5.1. Efectes en el teixit muscular.

A) Captació de glucosa per la cèl.lula.

Si bé als voltants dels anys cinquanta hi havia controvèrsia a propòsit de si l'increment de l'entrada intracel.lular de glucosa era deguda a una estimulació de la glucòlisi mitjançant la desinhibició de l'hexoquinasa (Colowick, 1.947), o bé a una facilitació del transport a través de la membrana cel.lular

Q U A D R E 2.I

<u>ACCIONS</u> DE <u>LA</u> <u>INSULINA</u>	
<u>Lloc d'acció :</u>	<u>Minva :</u>
MÚSCUL	<u>Incrementa :</u> Transport de glucosa Glucòlisi Formació de glucogen
TEIXIT ADIPOS	Esterificació Síntesi d'àcids grassos Captació de triglicèrids Lipòlisi
FETGE	Captació de glucosa Síntesi de glucogen Síntesi d'àcids grassos Síntesi de triglicèrids Gluconeogènesi

(Levine, 1.950), aquesta segona hipòtesi ha anat prenent cos (Randle, 1.962) (Newsholme, 1.964), mentre que l'altra no s'ha pogut confirmar.

Els mecanismes d'entrada de glucosa a la cèl·lula poden basar-se en una difusió simple o bé en una difusió facilitada amb el concurs d'un portador. Això es refereix al cas en que la concentració de glucosa extracel·lular sigui superior a la intracel·lular, ja que el transport actiu de glucosa contra un gradient de concentració, que té lloc només a l'intestí durant l'absorció dels productes de la digestió i al ronyó en la reabsorció tubular, té unes característiques diferents (Randle, 1.962). Hom sap que el procés de difusió facilitada pot ser modificat per factors a part de la concentració extracel·lular de glucosa, com per exemple l'anaerobiosi, metzines respiratòries o agents desacobladors (Randle, 1.958), (Morgan, 1.959). La insulina actua d'una manera semblant, tot augmentant la velocitat del sistema de transport i l'afinitat del portador per la glucosa.

B) Estimulació de la glucòlisi.

Està comprovat que la presència d'insulina estimula l'activitat hexoquinàsica i de tota la glucòlisi en general. No obstant això, s'ha dit que l'explicació

d'aquest fet podria basar-se en una acceleració de la glucòlisi a conseqüència de l'augment de glucosa intracel·lular (Newsholme, 1.964).

C) Estimulació de la formació de glucogen.

La insulina estimula la formació de glucogen a partir de UDPG-glucosa, incrementant la presència de la forma I de la UDPG-glucosiltransferasa, enzim regulador del procés. La forma I és més eficaç per a la síntesi de glucogen que no pas la D. El mecanisme no es basa en una modificació de la concentració de c-AMP, ja que aquesta no és alterada per la insulina en el teixit muscular, sinó en una desviació de l'equilibri entre la proteïna-quinasa inactiva i la proteïna-quinasa activa cap a la primera, que no es capaç de desplaçar la forma I de la UDPG-glucosiltransferasa cap a la forma D (Figura 2.3) (Villar-Palasi, 1.967), (Goldberg, 1.967), (Craig, 1.969).

D) Altres accions.

Hi ha funcions importantíssimes que també son activades per la insulina, com ara, el transport intracel·lular d'aminoàcids, la síntesi de RNA i proteïnes, el transport de potassi a través de la membrana cel·lular, etcètera.

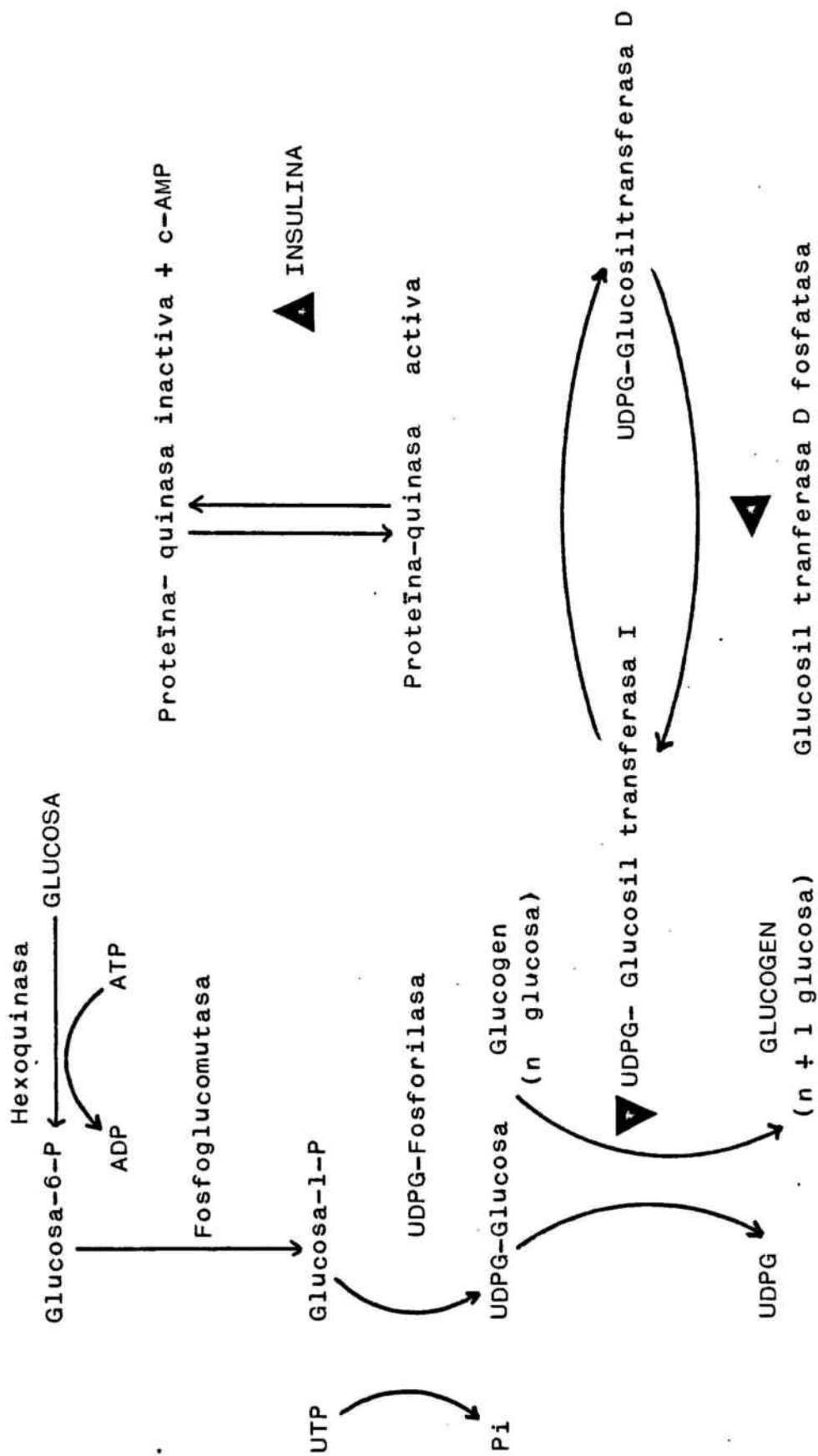


Fig. 2.3. Resum esquemàtic de la intervenció de la insulina en la síntesi de glucogen al múscul, basat en la interpretació de A.E. Newsholme i C.Start (Newsholme, 1.977)

2.1.5.2. Efectes en el teixit adipós.

A) Transport de glucosa i estimulació de la glu
còlisi.

Tenen característiques semblants a les del tei-
xit muscular.

B) Increment de la lipogènesi.

La insulina estimula la síntesi d'àcids grassos a partir de lactat i de piruvat (Coore, 1.971). El mecanisme probable és un desplaçament de l'enzim regulador, piruvat deshidrogenasa, cap a la forma desfosforillada, més activa.

C) Inhibició de la lipòlisi.

La presència d'insulina rebaixa la hidròlisi dels esters grassos de la glicerina. El mecanisme es basa en una disminució de l'activitat de la trigliceridolipasa ocasionada per una baixa en la concentració de c-AMP, provocada per la insulina (Butcher, 1.966).

D) Increment de la captació de triglicèrid plasma
màtic.

La captació de triglicèrid plasmàtic és afavorida per la insulina, tot incrementant l'activitat de la lipoproteïna-lipasa (Wing, 1.968), (Loten, 1.970).

2.1.5.3 Efectes en el fetge.

A) Captació de glucosa.

Un dels importants papers que juga el fetge és el de la regulació de la glucèmia. Sembla que és la inulina la que controla aquest procés, provocant la captació de glucosa quan la glucèmia és elevada. Ara bé, el transport de glucosa a través de la membrana cel·lulular no és modificat per la insulina, ja que l'hepatòcit és permeable a la glucosa. El paper de la insulina sembla ser el de l'estimulació de la síntesi de l'enzim glucoquinasa (Weber, 1.965), (Steiner, 1.964).

El principal responsable de la captació de gluglucosa de la sang per part del fetge és la glucoquinasa. Aquest enzim és responsable de la fosforilació de la glucosa en la cél.lula hepàtica, es a dir, el primer pas de la glucòlisi que en els altres teixits és rearealitzat per l'hexoquinasa. La diferència entre ambdós enzims és que la glucoquinasa té una constant de MichaMicha

elis molt més alta, es a dir menys afinitat per la glucosa, i per tant la concentració de l'enzim tindrà una influència molt més gran.

B) Increment de la síntesi de glucogen.

La insulina afavoreix la síntesi de glucogen estimulant la producció de UDPG-glucosiltransferasa i al mateix temps, la predominància de la forma I d'aquest enzim (Steiner, 1.964). Això ho aconsegueix gràcies al descens de la concentració de c-AMP que la insulina provoca en l'hepatòcit (Krebs, 1.966).

C) Disminució de la gluconeogènesi.

La depressió del nivell de c-AMP provocada per la insulina podria ser la causa de la inhibició de la síntesi de glucosa a partir d'aminoàcids i glicerol (Exton, 1.970). La disminució d'aquests precursors en el plasma també és un factor a considerar.

D) Altres efectes de la insulina en el fetge.

A part de les accions descrites anteriorment, cal esmentar l'increment de la síntesi d'àcids gra-

ssos, l'esterificació de triglicèrids, la inducció de la síntesi de RNA i proteïnes (Komer, 1.965), l'augment de l'entrada de potassi a la cèl.lula, etcètera.

En resum, pot dir-se que la insulina és la principal responsable de que la glucosa, que és present al torrent circulatori a elevades concentracions després dels menjars, penetri a la cèl.lula muscular. Un cop a dins facilita el camí metabòlic cap a la glucòlisi, o bé, l'emmagatzemament en forma de glucogen.

Al teixit adipós facilita la formació, i al mateix temps inhibeix la saponificació de triglicèrids, que són el seu principal reservori d'energia. Un excés d'insulina afavoreix, doncs, l'augment del contingut lipídic de l'adipòcit i per tant pot ocasionar una predisposició a l'obesitat.

Al fetge, que és un important regulador de la glucèmia, un augment de la insulinèmia fa que es passi de la cessió a la captació de glucosa. Així, durant el dejuni, la hipoinsulinèmia permet el procés gluconeogènic i glucogenolític, mentre la hiperinsulinèmia postprandial estimula la glucòlisi i la formació de glucogen (Siegenthaler, 1.977).

2.1.6. Receptors insulínics.

La insulina actua a nivell cel.lular fixant-se a receptors específics que hom sap que es troben a la membrana (Levine, 1.965), (Cuatrecases, 1.969). El receptor insulínic de les cèl.lules adiposes ha pogut extraure's, veient-se que és de naturalesa proteica, probablement una glicoproteïna, de massa molecular relativa aproximada de tres-cents mil (Cuatrecases, 1.972).

S'ha vist que els llocs d'unió específica són limitats. Així per exemple, en el teixit adipós no poden unir-se més de cent mil molècules d'insulina per cèl.lula (Cuatrecases, 1.971). Aquesta unió específica és reversible, essent possible la determinació de les característiques cinètiques així com de la influència de diversos factors (Roth, 1.973).

Degut a la dificultat de mesurar la quantitat de receptors insulínics en les cèl.lules dels teixits hepàtic, muscular i adipós, s'han buscat unes cèl.lules més assequibles, que reproduïxin la situació dels receptors insulínics de les cèl.lules dels teixits esmentats. S'havia pensat que els limfòcits complien aquesa condició (Gavin, 1.973), (Gavin, 1.974) (Archer, 1.973), però estudis ulteriors no accepten el limfòcit com a cèl.lula diana per a la insulina i si, en canvi, el monòcit (Blecher, 1.977), (Bordes, 1.979).

Els receptors insulínics pot ser que tinguin influència en alguns trastorns del metabolisme dels carbohidrats, que no serien ocasionats per una deficiència de la secreció pancreàtica d'insulina, sinó per una dificultat d'aprofitar-la per part de les cèl·lules.

2.1.7. Antagonistes de la insulina.

Són substàncies que contrarresten l'acció de la insulina. Els més importants són hormones amb mecanismes d'acció oposats als de la insulina. També s'han descrit inhibidors sèrics no hormonals (Vallance-Owen, 1.964), (Flier, 1.975).

A) Gucagó.-

La funció del gucagó pancreàtic ha estat qüestionada durant unes quantes dècades, però actualment sembla que a l'igual que la insulina, és extraordinàriament important en el control puntual de l'homeostasi de la glucosa, de certs aminoàcids i potser dels àcids grassos. El normal funcionament de la cèl·lula alfa sembla essencial per a la òptima gluco-regulació mentre un mal funcionament pot causar, contribuir o ser

el resultat d'una gran varietat de desordres metabòlics, el més freqüent dels quals és la diabetis mellitus.

S'ha vist que el glucagó té una forta activitat glucogenolítica (Sutherland, 1.948) i gluconeogènica (Kalant, 1.956) a concentracions fisiològiques. A més, pot tenir activitat lipolítica en algunes espècies (Steinberg, 1.959). Aquests efectes són contraris als de la insulina, que pot ser tinguda com una hormona d'emmagatzemament d'energia, secretada principalment durant l'influx d'aliments exògens, mentre que el glucagó pot considerar-se com una hormona d'alliberament d'energia que mobilitza reserves endògenes.

La juxtaposició de les cèl·lules beta i alfa pot ser considerada una simple unitat funcional bice^llular. A partir de les accions diametralment oposades de llurs respectives hormones controla el moviment de glucosa i certs aminoàcids endins i enfora de les cèl·lules del cos en funció de les necessitats d'energia i de l'aportació exògena de la mateixa (Unger, 1.971).

B) Hormona del creixement.

La somatotropina, o hormona del creixement, estimula, la mobilització d'àcids grassos des del teixit adipós. Això causa una elevació del nivell plasmàtic

dels cossos cetònics, que ocasiona una disminució del consum de glucosa per part de la cèl.lula muscular, així com un increment de la gluconeogènesi hepàtica (Ketterer, 1.957).

C) Adrenalina.

Actua, sobre tot, en situacions tenses en què és necessari un consum addicional d'energia, estimul·lant l'activitat de la fosforilasa i de la triglicèridolipasa. La conseqüència és un augment de la glucogènolisi i la hidròlisi de triglicèrids, tot augmentant el nivell de glucosa i àcids grassos en sang (Dieterle, 1.970).

D) Cortisol.

Els glucocorticoides interfereixen en la utilització de la glucosa sanguínia oposant-se a l'acció degradatòria de la glucòlisi. Al mateix temps incrementen la gluconeogènesi hepàtica i muscular (Baruch, 1.973). Això ocasiona que la glucosa no sigui convenientment retirada del torrent circulatori i que s'origini, per tant, una situació d'intolerància a la glucosa en els casos d'hipercorticisme.

E) Tiroxina.

La meitat, aproximadament, dels malalts amb hi pertiroïdisme presenten una alteració de la tolerància a la glucosa (Emmer, 1.971). Com que hi ha una elevada resposta insulínica a la sobrecàrrega de glucosa, s'ha postulat un antagonisme en front de la insulina que podria estar lligat a un augment de la concentració sèrica d'àcids grassos lliures (Dieterle, 1.969).

El principal mecanisme d'acció de la majoria de les hormones esmentades sembla ser un augment dels nivells d'c-AMP, via una activació de l'adenilciclase o una inhibició de la fosfodiesterasa (Siegenthaler, 1977). El c-AMP estimula la glucogenòlisi, la lipòlisi i la gluconeogènesi hepàtica (Sutherland, 1.965), accions inverses a les de la insulina.

F) Insulinasa.

Aquest enzim, que probablement és una glutatió-insulina transhidrogenasa, és d'origen renal i hepàtic. Cap el segon i el tercer trimestres de l'embaràs la placenta el produeix de manera considerable. La seva

funció és degradar la insulina. Per això, en la malaltia renal severa la vida mitjana de la insulina augmenta, podent-se originar, per tant, hipoglucèmies. El fet de que en l'embaràs la tolerància a la glucosa empitjori podria ser degut a una hipoinsulinèmia causada per una més gran degradació de la insulina (Freinkel, 1.962), encara que altres estudis semblen desmentir-ho (Bellman, 1.975).

G) Sinalbúmina.

La fracció albumina del sèrum d'alguns pacients diabètics és capaç d'inhibir en certa mesura l'acció de la insulina en l'assaig biològic, es a dir l'estimulació de la captació de glucosa pel diafragma de rata. Això va portar a pensar que en el sèrum d'aquestes persones hi havia un antagonista de la insulina anomenat sinalbúmina que era el causant de llur malaltia (Vallance-Owen, 1.958). Tot i que en certs grups de treball la idea va ser ben acollida (Sherman, 1.966) (Kammerer, 1.970), el més probable és que la sinalbúmina sigui un artefacte procedent de l'extracció d'albúmina del sèrum (Ensinck, 1.967).

2.2. DIABETIS MELLITUS I ALTRES CATEGORIES D'INTOLERÀNCIA A LA GLUCOSA.

La diabetis mellitus i les seves complicacions constitueixen la tercera causa de la mortalitat en els països industrialitzats, precedida només per les malalties cardiovasculars i el càncer. Les conseqüències econòmiques i socials són de gran importància degut a l'elevada incidència i improbable reversibilitat.

Tot i que la simptomatologia aguda de la diabetis, sovint de caràcter letal, pugui controlar-se amb la terapèutica insulínica, les complicacions a llarg termini redueixen l'esperança de vida en un terç. Comparats amb els no diabètics, els diabètics presenten un percentatge de ceguera vint-i-cinc vegades més gran, disset vegades més gran per les malalties renals, cinc vegades per la gangrena i dues per les cardiopaties (Notkins, 1.979).

Molts aspectes de la diabetis no estan gens aclarits, però sembla cert que la síndrome diabètica ve donada per un conjunt heterogeni de malalties que s'hau-

ran d'anar esbrinant i classificant de manera independent a mesura que es vagin adquirint els coneixements necessaris per a fer-ho.

2.2.1. Història.

La diabetis mellitus és una malaltia coneguda des de l'Edad Antiga. La primera descripció dels seus símptomes es troba al papirus d'Ebers (Egipte), que data de l'any 1.500 a.C. En el segle II d.C., Areteus de Capadòcia va denominar-la diabetes, paraula grega que vol dir "córrer a través d'un sífó". La descriu així: "és un estrany mal que consisteix en que la carn i els ossos flueixen junts per l'orina". Al segle VI els metges hindús varen adonar-se que l'orina dels diabètics tenia un gust dolç. No obstant això, fins al segle XVIII el gust dolç no es va identificar com glucosa, afegint-l'hi la paraula mellitus, és a dir, gust de mel.

A partir de l'any 1.889, quan Minkowski i von Mering descobriren que el pàncreas secretava una substància capaç de regular el metabolisme de la glucosa, els avenços en el coneixement i terapèutica d'aquesta

malaltia van lligats estretament a la insulina.

2.2.2. Descripció.

La diabetis mellitus primària o idiopàtica és un desordre metabòlic, genèticament determinat, caracteritzat per una deficiència absoluta o relativa d'insulina. Quan es manifesta clínicament de manera plena, es caracteritza per hiperglucèmia en dejú, malaltia vascular ateroscleròtica i microangiopàtica així com neuropatia.

Cal distingir la diabetis mellitus primària de les formes secundàries de diabetis o intolerància als carbohidrats que resulten de la destrucció del pàncreas a conseqüència de malaltia o d'intervenció quirúrgica, de malaltia endocrina amb excessiva secreció de glucocorticoides, hormona del creixement, aldosterona, catecolamines, glucagó o somatostatina, de l'administració d'esteroides o fàrmacs o de malaltia del sistema nerviós central. També hi ha síndromes genètiques associades a la intolerància a la glucosa (Rimoin, 1.971).

Fa unes quantes dècades qualsevol definició de

diabetis mellitus posava molt d'èmfasi en la presència contínua d'hiperglucèmia i glucosúria. Actualment encara es considera una condició molt important, bé que no indispensable. Les típiques manifestacions vasculars i neurològiques poden donar-se en pacients amb predisposició genètica, tot i tenir una intolerància a la glucosa moderada i la glucèmia dins els marges normals.

Una definició de què és la intolerància a la glucosa és difícil, ja que no hi ha una clara separació entre tolerància normal i anormal que es basi en factors diferents de les dades bioquímiques. D'altra banda no s'ha trobat una distribució bimodal, sinó contínua, entre el metabolisme normal i patològic dels carbohidrats (Fajans, 1.965). En tot cas, cal tenir sempre en compte a l'hora de fixar criteris diagnòstics, la naturalesa heterogènia de la diabetis mellitus en quant a etiologia i patogènesi, i el fet de que en la història natural de la malaltia pot donar-se gran variabilitat a dintre dels diferents tipus de la mateixa.

Des del punt de vista clínic hom reconeix dos tipus de diabetis mellitus primària o idiopàtica. En la diabetis de tipus juvenil, segons la nomenclatura

antiga, o del tipus I segons l'actual, hi ha una deficiència insulínica completa. El pacient és propens a la cetosi i depèn de la insulina exògena per a la seva supervivència. Normalment, aquest tipus de diabetis és reconegut durant la infància o l'adolescència. No obstant això, pot aparèixer a qualsevol edat. Quan no és tractada, ve associada amb símptomes aguts secundaris a la deficiència insulínica, com ara poliúria, polidípsia, polifàgia, pèrdua de pes, fatiga, et cètera. L'altre tipus principal és la diabetis del adult, en nomenclatura antiga, o del tipus II en nomenclatura actual. Aquesta diabetis és insulinoindependent en tant que el pacient no presenta cetosi quan no és tractat amb insulina exògena, com el cas de la diabetis del tipus I. Per aquest motiu se l'anomena cetosi-resistent. Malgrat això hi ha casos en que hom requereix la terapèutica insulínica per a corregir la hiperglucèmia en dejú. En altres casos aquest objectiu pot aconseguir-se amb una dieta adequada, a més de fàrmacs orals. La diabetis de tipus II no s'associa, normalment, a símptomes d'insuficiència insulínica, i gairebé sempre es diagnostica a persones d'edat mitjana o avançada. No obstant això des de 1.960 hom reconeix que també pot donar-se en gent jove, havent-se trobat sobre tot

en parents de primer grau de pacients amb aquest tipus de diabetis (Fajans, 1.976). Més endavant s'exposen els criteris per a la classificació de la diabetis mellitus i altres categories d'intolerància a la glucosa (2.2.7.).

Les manifestacions bioquímiques i clíniques de la diabetis formen un ventall que va de la forma assimptomàtica fins a la que cursa amb descompensacions metabòliques agudes (cetoacidosi, coma hiperosmolar), o amb complicacions cròniques o associacions (complicacions de l'embaràs, cataractes, neuropaties, aterosclerosi, microangiopaties). Com que la hiperglucèmia i les complicacions cròniques es troben tant en la diabetis juvenil, tipus I, com en la diabetis del adult, tipus II i com que ocasionalment ambdós poden donar-se en individus d'una mateixa família, s'havia pensat que només hi havia una diferència quantitativa en el defecte de secreció insulínica i en les seqüeles consegüents. No obstant aixó, s'ha acumulat evidència de que hi ha heterogeneïtat en la diabetis mellitus idiopàtica en els següents aspectes: 1) herència, 2) factors ambientals, 3) resposta insulínica a la sobrecàrrega de glucosa, i 4) prevalència de malaltia vascular. Sembla que la dia

betis idiopàtica no és una simple malaltia, sinó una síndrome que comprèn diverses malalties. D'aquesta manera podria comparar-se a la hipertensió, que és ocasionada per diversos mecanismes patogenètics, cadascun dels quals, però, pot associar-se a les mateixes complicacions vasculars (Fajans, 1.979).

2.2.3. Etiologia i patogènesi de la diabetis mellitus.

En la diabetis mellitus primària sembla que hi ha involucrats a la vegada factors genètics i ambientals. Diversos factors ambientals, sobreposats a diferents susceptibilitats genètiques, poden ser importants en la patogènesi de les diverses formes de la malaltia.

De l'estudi dels diferents factors s'arriba a la conclusió de que existeix una marcada heterogeneïtat entre la diabetis insulínol independent i la diabetis no insulínol independent (Creutzfeldt, 1.976), (Zonana, 1.976).

2.2.3.1. Influència dels factors genètics.

A) Anàlisi genealògica.

Els models de la herència en la diabetis s'han estudiat en famílies de nens afectats per diabetis in sulinodependent o no insulinodependent (Tattersall, 1.975), havent donat uns resultats que confirmen que ambdós tipus de diabetis ténen orígens genètics diferents (MacDonald, 1.974).

B) Sistema d'histocompatibilitat (HLA).

En la diabetis insulinodependent s'ha trobat una susceptibilitat genètica lligada al sistema HLA. La recerca d'una associació entre el sistema HLA i una malaltia concreta té més probabilitats d'èxit quan es dóna amb més freqüència en membres de determinades fa mílies i semblen presents els virus i l'autoimmunitat. En la diabetis insulinodependent es donen totes aquestes circumstàncies. Els gens anomenats determinants de la resposta immune formen part, probablement, del sistema HLA. Si això és cert, l'associació observada entre la malaltia i almenys quatre tipus d'antigens de superfície, HLA-A,B,C i D del cromosoma 6, caldria considerar-la secundària a una associació primària a determinants de la resposta immune (Sveigaard, 1.976).

HLA-B8, BW15, B18, A1, CW3, DW3 i DWA s'han trobat amb més freqüència en la diabetis insulíndependent però no en la diabetis no insulíndependent. En els subjectes que ténen dos d'aquests antigens, el risc sembla additiu, suggerint que podria venir per dos mecanismes diferents. B7 i B5 s'han trobat amb una freqüència disminuïda en la diabetis insulíndependent però no en la diabetis no insulíndependent. Això reforça el concepte de que ambdós tipus de diabetis són dues entitats nosològiques diferents. És probable que en la diabetis insulíndependent, al marge de l'edat d'inici, hi hagin un o més gens que puguin incrementar la susceptibilitat de la cèl.lula beta a deteriorar-se, al permetre la interacció d'un virus amb antigens específics de la membrana cel.lular. Si aquesta interacció no aconsegueix eliminar un virus infectiu, pot ocasionar-se una invasió vírica directa, amb la consegüent destrucció de les cèl.lules beta. Alternativament, aquesta interacció entre el virus i el receptor de membrana pot modificar adversament una resposta immune, resultant-ne un procés autoimmune amb destrucció de les cèl.lules beta per mitjà de la immunitat cel.lular. D'altra banda, els antigens B7 i B5 podrien impartir un efecte protector contra el dany a la cèl.lula beta (Cudworth, 1.976) (Nerup 1.976).

C) Immunitat cel.lular.

En la diabetis mellitus s'ha detectat immunitat òrgano-específica de tipus cel.lular, emprant dues tècniques "in vitro". Una és la prova d'inhibició de la migració leucocitària. S'han trobat resultats positius utilitzant extractes de pàncreas de porc, vedella i persones normals (així com cèl.lules d'insulinoma) com antigen. La mateixa prevalència de proves positives s'esdevé al marge de que el pacient tingui o no anticòssos anti-cèl.lula beta o que se l'hi hagi administrat insulina. L'altre és la prova de transformació limfocitària. La transformació de limfòcits induïda per mitògens que els converteixen en cèl.lules blàstiques és una important alternativa per a l'estudi de la immunitat cel.lular. Amb aquestes i altres proves s'ha arribat a la conclusió de que la diabetis insulíndependent pot molt ben ser una malaltia d'autoagressió (Huang, 1.976).

D) Immunitat humoral.

En una bona part de pacients amb diabetis insulíndependent s'han detectat anticòssos circulants dirigits contra cèl.lules d'insulinoma humà. Aquests anticòssos no estaven relacionats amb l'administració

d'insulina exògena i eren de les classes IgM i IgG (Lendrum, 1.975). Només un percentatge molt petit de pacients amb diabetis no insulíndependent presenten aquests anticòssos (Irvine, 1.977).

2.2.3.2. Influència dels factors ambientals.

Factors ambientals, sobreposats a una predisposició hereditària, poden ser essencials per al desenrotllament d'una diabetis clínic. Els factors ambientals que poden precipitar la irrupció de la malaltia són variats. Recentment, els virus han estat implicats en la patogènia de la diabetis insulíndependent, mentre que factors nutricionals sembla ser que juguin un important paper en la patogènesi de la diabetis no insulíndependent (Ross, 1.976).

Una variació estacional en la incidència de la diabetis insulíndependent d'irrupció juvenil ha estat observada. Això significa que aquests factors ambientals poden ser de tipus víric. Alguns virus han estat considerats com a possibles responsables, entre els quals hi ha el virus Còxsackie B₄, el de les galteres, hepatitis, rubéola, etcètera. No obstant això, les proves aportades són moltes vegades contradictòries i incon-

clusives. La diabetis podria ser el resultat d'una sèrie d'infeccions que haurien acumulat el dany pancreàtic. Una altra possibilitat seria que la infecció viral desencadenés una reacció autoimmune, que un cop iniciada continuaria destruint la cèl.lula beta.

En el cas de la diabetis no insulíndependent, que té una predisposició genètica de tipus diferent, serien uns altres els factors que conduirien a la hiperglucèmia, com ara, la sobrenutrició, la obesitat o l'embaràs (Tattersall, 1.975).

2.2.4. Història natural i curs de la diabetis mellitus.

La història natural de les dues formes de diabetis idiopàtica, la insulíndependent i la no insulíndependent, si no es tracten d'una manera adequada es caracteritza per l'aparició de complicacions agudes, com ara el quadre d'hiperosmolaritat i altres concomitants que afecten diversos òrgans i sistemes. La cetoacidosi està, sobre tot, limitada a la varietat insulíndependent, encara que ocasionalment pugui donar-se en pacients insulíndependents sotmesos a certes circumstàncies de " stress ", com ara, pneumònia, intervencions quirúrgiques, cremades i traumes emocionals i físics.

Les complicacions concomitants de la síndrome diabètica són de tipus crònic i inclouen desarranjaments que entren dintre les microangiopaties, macroangiopaties i neuropaties. Encara que la majoria de complicacions concomitants donen en els dos tipus de diabetis, hi ha diferències molt importants. Cal destacar que la major causa de morbiditat i mortalitat en diabètics insulíndependents és la nefropatia diabètica i les seves seqüeles, que inclouen azotèmia, acidosi tubular, i pericarditis urèmica, entre d'altres. La principal causa de mortalitat i morbiditat en diabètics no insulíndependents és la malaltia isquèmica coronària i les seves seqüeles.

Quan aquests signes clínics són presents, la diabetis es troba en el més avançat dels seus estadis i s'anomena diabetis manifesta o franca. Abans, però, d'arribar a aquesta situació pot ser que l'individu diabètic hagi passat per unes etapes en què les anomalies eren detectables, només, per mètodes biomètrics. Aquestes diferents etapes de la diabetis mellitus van ser definides l'any 1.965 per un grup d'experts sota l'encàrrec de l'Organització Mundial de la Salut (WHO Expert Committee, 1.965) de la següent manera:

I Diabetis potencial (pre-diabetis).

Aquesta situació és pròpia de persones que tenen grans probabilitats de patir diabetis, malgrat no presentar, encara, cap símptoma i tenir valors normals de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa.

Hom considera diabètics potencials:

- a) Germans bessons uniovulars de diabètics.
- b) Persones amb pare i mare diabètics, o bé un d'ells diabètic i l'altre fill o germà d'un diabètic.
- c) Dones que han donat llum a nadons, vius o morts, amb més de 4,5 kg de pes, o bé prematurs no deguts a incompatibilitat de Rh, amb hiperplàsia dels illots de Langerhans del pàncreas.

El terme prediabetis també es pot emprar en el cas d'una diagnosi retrospectiva, referida al període de vida transcorregut entre la concepció i la confirmació de que hom pateix diabetis.

II Diabetis latent.

Aquesta situació és pròpia de persones amb valors habitualment normals en la prova de sobrecàrrega oral de glucosa, però que ocasionalment poden presentar-

los patològics, sobre tot en condicions desfavorables com ara l'embaràs, infeccions, "stress", obesitat, etcètera. La prova de tolerància a la cortisona-glucosa pot donar valors de tipus patològic.

III Diabetis assimptomàtica o química.

Aquest estat, anomenat també diabetis subclínica, el presenten pacients que tenen valors patològics de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa, tot i que no presenten símptomes de diabetis mellitus.

IV Diabetis clínica.

És l'estat patològic que cursa amb els símptomes i signes característics de la diabetis mellitus. Per això se l'anomena també diabetis manifesta. De no ser tractada convenientment causa hiperglucèmia continuada i, moltes vegades, glucosúria. Els resultats de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa es disparen de manera extraordinària.

2.2.5. Intolerància a la glucosa independent de la diabetis mellitus.

Hi ha una sèrie de malalties i circumstàncies

diverses que donen lloc a una alteració de la tolerància a la glucosa, i en casos extrems a hiperglucèmia continuada. Quan aquests fets es donen al mateix temps que una diabetis idiopàtica, poden agreujar-la extraordinàriament. Quan es presenten sols poden arribar a mimetitzar una diabetis autèntica. Per aquests motius és fonamental tenir-los en compte a l'hora d'establir un diagnòstic. La característica més comuna, quan no hi ha involucració pancreàtica, és que la resposta insulínica és superior a la normal. Això pot entendre's com una reacció del pàncreas endocrí als altíssims nivells de glucosa circulant.

2.2.5.1. Afeccions pancreàtiques.

La pancreatitis crònica i els tumors pancreàtics sovint s'associen amb una alteració de la tolerància a la glucosa, deguda possiblement a una reducció de la massa de cèl·lules beta funcionals (Friedlander, 1.974). L'alteració de la tolerància a la glucosa ja pot presentar-se després d'una sola crisi aguda de pancreatitis (Johansen, 1.972).

En la majoria dels pacients amb fibrosi quí-

tica del pàncreas la tolerància a la glucosa empitjora; en casos greus pot presentar-se, també, hiperglucèmia en dejú (Milunski, 1.971). La causa sembla ser una de posició de teixit fibrós entre les cèl.lules beta.

En més de la meitat dels casos d'hemocromatosis es dóna diabetis mellitus. No s'ha pogut determinar si això és conseqüència de l'acumulació de ferro al pàncreas, o bé d'una predisposició genètica (Dymock, 1.971).

2.2.5.2. Glucagonoma.

El glucagó eleva la producció de glucosa al fetge, però també estimula la producció d'insulina. Un tumor de les cèl.lules alfa, productor de glucagó, influeix poc sobre la tolerància a la glucosa si la funció de les cèl.lules beta segueix intacta (Levin, 1.968). No obstant això, alguns tumors productors de glucagó donen lloc a hiperglucèmies difícils de controlar (Leichter, 1.975).

2.2.5.3. Síndrome de Cushing.

Les dosis elevades de glucocorticoides interfereixen la utilització de glucosa i incrementen la gluconeogènesi. La tolerància a la glucosa empitjora en prop d'un 80 % dels pacients amb síndrome de Cushing; hom comprova una hiperglucèmia en dejú en un 20 % dels casos, aproximadament (Emmer, 1.971). En la síndrome de Cushing el nivell d'insulina és elevat en dejú, i segueix augmentant amb la sobrecàrrega de glucosa, situació que recorda l'obesitat.

2.2.5.4. Acromegàlia.

L'excés de l'hormona del creixement altera la tolerància a la glucosa d'un vint-i-cinc a un seixanta per cent dels casos, provocant hiperglucèmia basal en algun d'ells (Dieterle, 1.969).

2.2.5.5. Feocromocitoma.

S'anomenen així els tumors de la mèdulla adrenal que segreguen adrenalina, la qual desminueix la tolerància a la glucosa (Porte, 1.969), si bé el seu efecte és massa fugaç per a provocar diabetis permanent. Un cop extirpat el carcinoma la tolerància a la glucosa

es normalitza.

2.2.5.6. Hipertiroïdisme.

Aproximadament, un cinquanta per cent dels malalts amb hipertiroïdisme presenten intolerància a la glucosa. Sembla que la causa és una acció antagònica de la tiroxina vers la insulina, ja que els nivells d'aquesta es troben augmentats (Emmer, 1.971).

2.2.5.7. "Stress".

L'"stress" no pot, únicament, agreujar l'estat diabètic, sinó que també pot desencadenar una hiperglucèmia, encara que no hi hagi diabetis hereditària, degut a l'augment de la secreció de catecolamines (Jahnke, 1.970), glucagó i corticosteroides (Burkhardt, 1.972). Així, després de l'infart de miocardi, moltes vegades augmenta el nivell de la glucèmia, i això pot constituir junta-la persistent leucocitosi un signe de mal pronòstic (Modan, 1.975). La hiperglucèmia condicionada per l'"stress" s'ha observat, a més a més, en les intervencions quirúrgiques (Russell, 1.975), després de les cremades (Wilmore, 1.974) i després d'una

exposició involuntària al fred (Meriwhether, 1.972). En cas darrer, però, també és possible una hipoglucèmia deguda a la manca de reserves de glucogen.

2.2.5.8. Afeccions hepàtiques.

Les malalties cròniques del fetge empitjoren la tolerància a la glucosa, com és el cas de la cirrosi hepàtica sense hipertensió portal (Muting, 1.975). Les hepatopaties agudes, en canvi, acostumen a ocasionar hipoglucèmies.

2.2.5.9. Afeccions renals.

En les insuficiències renals avançades la tolerància a la glucosa està pertorbada, podent-se donar casos d'hiperglucèmia basal (Spitz, 1.970), (Hamper, 1.970). Això s'acompanya de nivells elevats d'insulina (Sorge, 1.975), així com d'hipertrigliceridèmia, que pot ser resultat d'un increment de la síntesi hepàtica induïda per la insulina (Quereda, 1.977).

La causa de la intolerància a la glucosa pot ser la retenció de substàncies que haurien d'haver es-

tat eliminades, cosa que no va aconseguir-se degut al mal funcionament renal (Cohen, 1.968), o bé a la hipopotassèmia (De Fronza, 1.973).

Hom reconeix que el tractament per diàlisi renal resol els trastorns del metabolisme hidrocarbonat, però hi ha discrepàncies sobre si és d'una manera només parcial (Hutching, 1.976), o bé total (Sindall, 1.971).

2.2.5.10. Dèficit de potassi.

La hipokalièmia disminueix la secreció d'insulina. Així, l'aldosteronisme primari, l'administració de salurètics, certes afeccions renals, etcètera, donen lloc a intolerància a la glucosa (Conn, 1.965).

2.2.5.11. Efectes secundaris medicamentosos.

Nombrosos fàrmacs poden provocar intolerància a la glucosa mitjançant una inhibició de la secreció insulínica, o bé per altres mecanismes. Aquesta acció, capaç d'agreujar extraordinàriament algunes diabetis que en principi eren benignes, pot arribar a provocar un coma hiperosmolar.

Com a fàrmacs susceptibles d'alterar la tolerància a la glucosa poden esmentar-se els diürètics tiazídics, el diazòxid la difenilhidantoïna, etcètera (Dollery, 1.971) (Levin, 1.972).

2.2.5.12 Obesitat.

Es un fet evident que l'obesitat empitjora la tolerància a la glucosa en moltes persones, en les que s'observa una millora quan hi ha una pèrdua de pes (Drenick, 1.975). Al mateix temps, pot dir-se que s'observa una correlació positiva entre el grau d'obesitat i la secreció d'insulina, tant si hi ha intolerància a la glucosa com si no n'hi ha. Aquesta hipersecreció dels obesos és, doncs, un caràcter adquirit ja que retrocedeix amb la pèrdua de pes (Felig, 1.971). No es coneixen bé les causes d'aquesta hipersecreció, si bé s'han proposat gran nombre d'explicacions. Així, s'ha atribuït a una resistència del teixit adipós hipertròfic (Salans, 1.968), (Salans, 1.971), a una disminució de la sensibilitat perifèrica que provocaria una hipersecreció compensadora (Butterfield, 1.965), a la presència d'antagonistes de la insulina (Davison, 1.972), a una hiperfunció suprarenal que donaria com a conseqüència una gluconeogènesi augmentada per efecte dels

corticosteroides, que es compensaria amb una hiperse_
creció insulínica (Schteingart, 1.965), etcètera. Estu_
dis realitzats amb models animals indiquen que la obe_
sitat és una condició progressiva que comprèn dues fa_
ses principals; en la primera encara no hi ha resistèn_
cia a la insulina, mentre que en la darrera la resis_
tència a la insulina és ostensible (Jeanrenaud, 1.979).
En la primera fase de l'obesitat els únics teixits que
presenten alguna alteració són el fetge i el teixit a_
dipós que són sobreestimulats per un excés d'insulina
que ocasiona una elevada secreció de VLDL-triglicèrid
per part del fetge, i una excessiva captació del mateix
per part del teixit adipós. No obstant això, aquest
procés és reversible i es torna a la normalitat quan
baixen els nivells d'insulina circulant (Assimakopou_
los-Jeannet, 1.976). En la darrera fase de l'obesitat,
la hiperinsulinèmia esdevé molt més pronunciada i a
més a més, apareix un estat de resistència a la insu_
lina que afecta al fetge, al múscul, i al teixit adi_
pós. Al mateix temps, hi ha un descens del nombre de
receptors insulínics, si bé això cal atribuir-ho a la
hiperinsulinèmia, ja que quan aquesta baixa, el nombre
de receptors insulínics torna a ser normal. Estudis
realitzats amb limfòcits T activats haurien demostrat

que l'obesitat per si sola podria fer disminuir tanma teix el nombre de receptors insulínics, cosa que també passaria amb la diabetis no insulíndependent, essent aquest descens independent de la concentració d'insulina (Helderman, 1.980).

Les persones obesas amb intolerància a la glucosa podria ser que tinguessin una reserva insulínica inferior a la de les que, tot i ser obesas, tenen normal la tolerància a la glucosa (Beck, 1.964). Per aquest motiu, la secreció insulínica, tot i ser considerablement superior a la dels individus normals no obesos, seria insuficient per a mantenir la glucèmia dintre dels límits normals (Felig, 1.971).

2.2.6. Relacions entre intolerància a la glucosa i dislipèmies.

Es ben conegut que la diabetis mellitus pot donar lloc a hiperlipoproteïnèmies secundàries del tipus I, IV i V, això és, les que es caracteritzen per un augment del triglicèrid sèric. D'altra banda, també sembla que la hipertrigliceridèmia endògena pot donar lloc a una intolerància a la glucosa (Sailer, 1.968).

Semblen existir tres síndromes a l'entorn d'aquestes interrelacions que semblen realment complexes. D'una banda la hipertrigliceridèmia, en pacients amb mínimes anomalies en la tolerància a la glucosa, s'esdevé conjuntament amb una pèrdua de la sensibilitat a la insulina, caracteritzant-se per una elevació del triglicèrid corresponent a lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL-TG) (Berstein, 1.978). S'ha suggerit que en aquest cas, les elevades concentracions de triglicèrid plasmàtic són secundàries a increments de la secreció de triglicèrid de VLDL pel fetge. A l'altra banda de l'espectre es troben els subjectes amb una absoluta deficiència insulínica, en els quals la hipertrigliceridèmia es deu, probablement, a una deficiente eliminació del triglicèrid del plasma, degut a la manca absoluta d'insulina (Risser, 1.978). La tercera síndrome clínica afecta la hipertrigliceridèmia en pacients amb diabetis no insulíndependent amb hiperglucèmia en dejú. La causa de la hipertrigliceridèmia en aquests pacients és dubtosa. Mesuraments directes del ritme de secreció de triglicèrid de VLDL suggereixen que la hipertrigliceridèmia és secundària a un increment en l'esmentada secreció (Nikkilä, 1.977). D'altra banda, un descens en l'activitat de la lipopro

teïnlipasa del teixit adipós, ha portat el suggeriment que el responsable dels elevats nivells de triglicèrid és la deficient eliminació dels mateixos (Pykälistö, 1.975).

Els baixos nivells de colesterol HDL, això és, la fracció que forma part de les lipoproteïnes d'alta densitat, s'associen clarament amb un increment del risc de malaltia isquèmica coronària (Miller, 1.975). L'efecte "benefactor" del colesterol HDL s'ha relacionat amb la seva funció transportadora, i per l'acció de competir en els receptors de LDL en la superfície cel.lular (Carew, 1976). Entre els diabètics es troba una prevalència d'hiperlipoproteïnèmia i malaltia isquèmica coronària força considerable, però no es relaciona directament amb la severitat de la diabetis, mesurada en funció del grau d'insulinodependència (Saudé, 1.979). Pacients amb diabetis manifesta, tant insulinodependents com no insulinodependents, s'ha demostrat que tenien nivells baixos de colesterol HDL (Tasinen, 1.979), la qual cosa concorda amb la més gran prevalència de malalties isquèmiques coronàries entre els diabètics.

Quan s'estudia la relació entre la concentració

plasmàtica d'insulina i el colesterol HDL en una població de subjectes no diabètics, es veu que els subjectes amb nivells alts d'insulina sèrica basal i postprandial tenen nivells de colesterol HDL baixos (Stalder, 1.981). Paral·lelament, estudis epidemiològics portats a terme a França per la Unité de Recherches Statistiques de l'Institut National de la Santé et la Recherche Médicale, han portat a la conclusió de que els nivells alts d'insulina poden constituir un factor independent de risc de complicacions cardíaques coronàries en homes no diabètics d'edat madura (Ducimetière, 1.980).

2.2.7. Classificació de la diabetis mellitus i altres categories d'intolerància a la glucosa.

Durant la darrera dècada, l'augment del coneixement de l'etiologia i patogènesi de la diabetis mellitus, va portar a un bon nombre d'individus i de grups que treballaven en aquest camp a sol·licitar una revisió de nomenclatura, criteris diagnòstics i classificació de la diabetis mellitus, en què s'intentés buscar un consens internacional. La necessitat sorgí de la manca d'uniformitat o consistència en el passat

per a definir la diabetis i les altres situacions d'intolerància a la glucosa, que portava com a conseqüència que les dades sorgides de diferents centres fossin difícils de comparar entre sí, amb la consegüent pèrdua d'utilitat i eficàcia. A més a més, mentre s'acumulava l'evidència de que la diabetis és una malaltia heterogènia, no hi havia un acord general per a classificar la síndrome en funció de l'etiologia o de les manifestacions clíniques. Aquests factors han fet difícil de calibrar l'impacte de la diabetis i les seves complicacions, així com de determinar l'epidemiologia dels diferents tipus de la malaltia. Com a conseqüència, va considerar-se essencial l'establiment d'una terminologia escaient i uniforme, així com d'una classificació funcional i operativa que reflectís els coneixements actuals sobre la malaltia. Per a acomplir aquesta tasca, un grup de treball internacional va reunir-se sota els auspicis del National Diabetes Data Group del National Institutes of Health, dels Estats Units. Fruit d'aquests treballs va ser un document que va circular àmpliament per bona part dels ambients interessats en el tema, com ara la American Diabetes Association, la Australian Diabetes Society i la European Association for the Study of Diabetes, i un cop recollits els suggeriments va sortir l'informe definitiu

(National Diabetes Data Group, 1.979). Posteriorment, va reunir-se un comitè d'experts de l'Organització Mundial de la Salut en la qual es recolliren els punts més importants de l'anterior document, proposant-se aquesta classificació com un marc uniforme on es situés la conducta clínica i la investigació epidemiològica (WHO Expert Committee, 1.980).

Els objectius de la classificació foren els següents:

1. Servir com a una base uniforme, en la qual es pugui conduir i planificar la recerca en diabetologia incloent-hi causes, tractament, aparició de complicacions i prevenció.

2. Servir com a marc per a la recollida de dades epidemiològiques sobre l'etiologia, història natural i l'impacte de la diabetis i les seves complicacions en poblacions diverses arreu del món.

3. Ajudar al clínic a categoritzar pacients amb diversos graus d'intolerància a la glucosa o posseint característiques que els col·loquin en situació espe-

cial de risc de desenrotllar una diabetis.

La terminologia i el sistema de classificació hagueren de seguir els següents requeriments:

1. Cal definir les classes de manera que siguin mútuament excloents, de manera que un subjecte, en un moment determinat de la seva vida, només pugui ser col·locat en una classe, encara que en un seguiment prospectiu canviï de característiques en un moment donat, i per tant calgui reclasificar-lo.

2. La classificació ha de basar-se en mesures i observacions descriptives, fàcilment obtenibles i amb significat biològic.

3. Les classes cal que siguin tan precises i ben definides com permetin els actuals coneixements de l'etiopatologia de la diabetis, de manera que cada classe contingui una població el màxim d'homogènia.

4. La terminologia ha de ser precisa i ben definida, describint l'expressió fenotípica de l'anomalia tant com sigui possible.

5. La classificació cal que sigui susceptible a la incorporació de les noves aportacions sobre l'etiopatologia de la diabetis.

La classificació resultant va constar de tres classes clíniques principals, ultra la inclusió d'algunes fases que formen part de la història natural de la malaltia.

2.2.7.1. Diabetis mellitus.

En els darrers anys ha quedat ben establert que la diabetis mellitus és un grup heterogeni de desordres, tant des del punt de vista genètic com del clínic. L'heterogeneïtat que hi ha en la síndrome diabètica té importants implicacions en la recerca i en la conducció de la diabetis; primer, diferents factors genètics i d'etiologia ambiental poden donar fenotipus diabètics semblants, i segon, diferents trastorns agrupats sota la qualificació de diabetics poden ser notablement diferents en patogènesi i història natural, així com en les respostes terapèutiques i mesures profilàctiques.

2.2.7.1.1. Tipus I: diabetis mellitus insulíndependent.

Com s'ha vist anteriorment (2.2.2. i 2.2.3) aquesta forma de diabetis es caracteritza, clínicament, per l'abrupta irrupció dels símptomes, la insulínopènia i la dependència de les injeccions d'insulina exògena, així com la tendència a la cetosi. Normalment es dóna en gent jove, encara que això no exclou que pugui debutar a qualsevol edat. Semblen importants els determinants genètics, expressats per l'associació amb augment o descens de la freqüència de certs antigens d'histocompatibilitat HLA, en el cromosoma 6. La presència d'anomalies immunològiques i anticossos anti-cèl·lula beta poden tenir implicacions etiològiques.

2.2.7.1.2. Tipus II: diabetis mellitus no insulíndependent.

Aquest segon tipus de diabetis, tal com s'ha vist prèviament (2.2.2 i 2.2.3), és el que anteriorment s'anomenava diabetis de l'adult ("maturity-onset diabetes"), ja que el seu inici es dóna, quasi sempre, a la maduresa de la vida. No obstant això, cal abandonar aquesta nomenclatura, ja que hi ha casos en què es presenta en individus joves. En alguns casos s'ha pogut establir l'existència d'una transmissió hereditària del tipus autosòmica dominant. Aquestes persones

no són insulínolndependents, en el sentit de que no cal administrar-els-hi insulina exògena per a prevenir la cetosi, encara que de vegades s'els hi administri per a fer-els-hi disminuir la glucèmia. Aproximadament d'un seixanta a un noranta per cent dels pacients amb diabetis no insulínolndependent són obesos. En aquests, la tolerància a la glucosa millora amb la pèrdua de pes. La hiperinsulinèmia i la resistència a la insulina són molt característiques d'aquests pacients obesos. Per aquests motius, aquest tipus es divideix en dos subtipus:

1. Diabetis no insulínolndependent, no obesos.
2. Diabetis no insulínolndependent, obesos.

2.2.7.1.3. Altres tipus de diabetis.

Aquesta subclasse engloba diversos tipus de diabetis, en alguns dels quals es coneixen les relacions etiològiques, com ara, la diabetis secundària a malalties pancreàtiques, endocrinològiques o iatrògenes. En altres, la relació etiològica es sospita degut a l'elevada freqüència de l'associació de la diabetis amb la síndrome o condició.

Cadascun dels tipus de diabetis descrit té característiques que el distingeixen dels altres dos. No obstant això, hi ha vegades en què pot resultar difícil assignar un individu a una classe ja que no es disposa de prou informació. Per exemple, distingir entre un diabètic insulíndependent i un pacient prim amb diabetis no insulíndependent a qui se l'hi ha prescrit tractament amb insulina, requeriria que se l'hi deixés d'administrar insulina i se l'hi controlés llavors el curs de la malaltia, cosa que pot resultar impracticable. Els examens addicionals que es requereixen per a determinar si un pacient té una diabetis secundària a altres condicions, pot ser que no s'hagin fet, i per aquest motiu alguns pacients siguin incorrectament classificats com a diabètics insulíndependents. D'altra banda, hi ha etapes en la història natural de cadascun dels tipus de diabetis mellitus que mimititzen característiques d'altres tipus, com ara la fase de remissió de la diabetis insulíndependent o la cetonúria que poden presentar pacients amb diabetis no insulíndependents sotmesos a "stress" metabòlic. Si aquestes etapes temporals es consideren de manera aïllada en comptes d'inserir-les en el context de la progressió de la malaltia, es faran classificacions errò

nies.

2.2.7.2. Tolerància a la glucosa alterada.

Com a conseqüència d'estudis prospectius a llarg termini amb poblacions de diversos països (Birmingham Diabetes Survey Working Party, 1.962), (Bennet, 1.976) (Zimmet, 1.978), (O'Sullivan, 1.968), varen poder-se obtenir les bases científiques útils per a definir una condició de tolerància a la glucosa alterada, en la qual les concentracions de glucosa plasmàtica en dejú són inferiors a la requerida per a diagnosticar una diabetis mellitus, i les concentracions de glucosa plasmàtica en resposta a la prova de tolerància a la glucosa oral són intermèdies entre les normals i les diabètiques. Així, doncs, la prova de tolerància a la glucosa oral és necessària per a situar un individu en aquesta classe.

Mentre que els individus col·locats en aquesta classe no es poden considerar diabètics, tenen un risc més elevat que la resta de la població d'adquirir una diabetis. En alguns pacients, la tolerància a la glucosa alterada representa un estadi de la història natural d'una diabetis no insulíndependent (i menys fre-

qüentment insulíndependent), podent-se esperar que d'un 1 a un 5 % de les persones amb tolerància a la glucosa alterada arribaran cada any a tenir una diabetis manifesta. No obstant això, molts dels qui havien tingut intolerància a la glucosa tornen espontàniament a una situació normal i una important part de les persones afectades roman en aquesta categoria molts anys. Per això, a fi i efecte d'evitar l'estigma psicològic i socioeconòmic del terme diabetis, és més apropiat designar la seva situació com a tolerància a la glucosa alterada, recomanant que els termes diabetis química, subclínica, assíptomàtica i latent siguin abandonats.

L'interès per detectar els casos de tolerància a la glucosa alterada descansa en la possibilitat d'influir per a evitar la progressió cap a la diabetis clínica, o per a detectar la diabetis abans que es desenvolupi i prevenir o amillarar les complicacions pròpies d'aquesta malaltia. No obstant això, l'estudi prospectiu a llarg termini realitzat a Bedford, Anglaterra, (Sharp, 1.964), no va donar cap evidència de que el tractament amb tolbutamida pogués prevenir l'aparició de diabetis clínica en aquest grup. Una millora en la tolerància a

la glucosa pot aconseguir-se a curt termini mitjançant una restricció calòrica, o pèrdua de pes, encara que es desconeixi quina és la influència a llarg termini que això pot tenir sobre el desenrotllament d'una diabetis clínica. Encara que en les persones amb tolerància a la glucosa alterada no s'observen complicacions renals ni de retina, molts estudis d'aquesta població han mostrat una prevalència incrementada de malaltia arterial, anomalies electrocardiogràfiques i mortalitat, així com una incrementada susceptibilitat a la malaltia arterioscleròtica associada amb altres coneguts factors de risc, com ara hipertensió, hiperlipidèmia i adipositat. Així, doncs, la tolerància a la glucosa alterada pot tenir implicacions pronòstiques en subjectes altrament sans, la qual cosa fa que no es pugui, en absolut, menystenir.

2.2.7.3 Diabetis gestacional.

Aquesta classe es restringeix a dones embarassades en les quals la irrupció, o descobriment, de la diabetis o tolerància a la glucosa alterada s'esdevé durant l'embaràs. Així, una dona diabètica que quedi embarassada no s'inclou en aquesta classe. A més a més, quan l'embaràs s'acaba cal classificar-la com a diabèe

tica o amb tolerància a la glucosa alterada, si els seus nivells de glucosa plasmàtica, després del part, assoleixen els nivells requerits, o bé com a persona amb intolerància a la glucosa prèvia si són normals. Aquest darrer cas és el més freqüent.

La diabetis gestacional es recomana com a classe separada degut a les especials característiques de la diabetis que es dona en l'embaràs. Pacients amb una diabetis assintomàtica, recentment diagnosticada en l'embaràs, en les quals no hi ha una història obstètrica adversa i en les quals un bon control pot obtenir-se simplement amb dieta, encara tenen un risc incrementat de morbiditat i mortalitat perinatal (O'Sullivan, 1.971). També hi ha una més gran freqüència de pèrdua de viabilitat fetal (O'Sullivan, 1.973).

Des del punt de vista clínic el reconeixement d'una diabetis gestacional és important degut a:

1. En els llocs on s'està en condicions de controlar amb eficàcia els embarassos d'alt risc, la teràpèutica pot prevenir molta de la mortalitat i morbiditat perinatal associades.

2. Aquestes dones tenen un risc més gran de tor-
nar-se diabètiques cinc o deu anys després del part.

Del 1 al 2 % de totes les embarassades presen-
ten diabetis gestacional. Les indicacions per a la pràc-
tica d'una prova de tolerància a la glucosa en dones
embarassades inclouen glucosúria, casos de diabetis en
parents de primer grau, presència de parts prematurs o
aborts en la història clínica de la pacient, la presèn-
cia d'una malformació fetal en un embaràs previ, l'ha-
ver donat a llum un nadó excessivament pesat, l'obesi-
tat, l'edat avançada i el portar cinc o més bessons
(Stowers, 1.975). La presència de més d'un d'aquests
factors de risc és especialment significativa.

Durant l'embaràs, especialment en el tercer tri-
mestre, es dóna una disminució de la tolerància a la
glucosa, i els nivells normals són, per tant, diferents
dels de les persones no embarassades. Per tant, els cri-
teris de tolerància a la glucosa en dones embarassades
són diferents dels de la resta de persones.

2.2.7.4. Anormalitat prèvia de la tolerància a la glu-
cosa.

Aquesta classe és restringida a aquelles persones amb tolerància a la glucosa normal, però que han mostrat en alguna ocasió hiperglucèmia diabètica o tolerància a la glucosa alterada, bé espontàniament bé en resposta a estímuls identificats.

Antigament s'havia utilitzat el terme prediabetis, o també el de diabetis latent, per a descriure aquesta situació; de totes maneres les persones amb anormalitat prèvia de la tolerància a la glucosa no són diabètiques, i per tant no és apropiat l'ús d'aquests termes, particularment a la llum de les sancions psicosocials i econòmiques que podrien imposar-se a unes persones pel fet de ser anomenades diabètiques.

Les dones que han tingut una diabetis gestacional i han tornat a tenir una tolerància a la glucosa normal després del part, constitueixen òbviament una subclasse dintre l'anormalitat prèvia de la tolerància a la glucosa. Tanmateix, l'embaràs és, possiblement, l'"stress" metabòlic associat amb més freqüència a la intolerància a la glucosa, i per aquest motiu, i degut a la importància d'aquest estat, s'ha definit una classe especial que inclou les dones que presen-

ten intolerància a la glucosa durant l'embaràs. No obstant això, un cop l'embaràs s'ha acabat cal reclassificar aquestes persones; si la tolerància a la glucosa torna als nivells normals, s'inclouran dintre l'anomalia prèvia de la tolerància a la glucosa, i si roman dintre dels nivells d'intolerància a la glucosa o diabèticis es consideraran com a tals.

Altres grups interessants són els de persones obesas que un cop s'han aprimat recuperen la normalitat de la tolerància a la glucosa, els de pacients que en la fase aguda d'un infart de miocardi han presentat hiperglucèmia i/o intolerància a la glucosa, persones que han sofert traumatismes com ara cremades, accidents que han ocasionat lesions òssies, ferides de guerra, cirurgia abdominal, infeccions, etcètera. Com que la interpretació de la prova de tolerància a la glucosa s'aplica només a persones altrament sanes i en règim ambulatori (2.3.4) sotmesos a unes condicions acuradament estandarditzades, i no a individus sotmesos a malaltia crònica o aguda, la interpretació d'una intolerància a la glucosa en molts dels estats descrits anteriorment és altament qüestionable.

2.2.7.5. Anormalitat potencial de la tolerància a la

glucosa.

Aquesta és una classe de risc estadístic que inclou persones que no han tingut mai intolerància a la glucosa, però que tenen un risc més alt que el de la resta de la gent d'arribar a adquirir una diabetis, degut a diversos motius. L'anormalitat potencial de la tolerància a la glucosa no es pot mai aplicar com un diagnòstic a un pacient, encara que el coneixement dels factors que incrementen el risc de diabetis pot ser vàlid per a aconsellar pacients no diabètics. El propòsit de la inclusió d'aquesta classe és el de ser utilitzada en estudis prospectius de recerca.

Els individus que tenen un risc elevat d'adquirir diabetis no insulíndependent inclouen (de major a menor risc) el bessó monocigòtic d'un diabètic no insulíndependent, un parent de primer grau (pare, germà, fill) d'un diabètic no insulíndependent, individus obesos, mares de nadons que pesaven al nèixer més de cinc kg i membres de grups racials o ètnics que tenen una alta prevalència de diabetis, com ara els mem**br**es de certes tribus d'indis americans. Els individus que tenen un risc elevat per la diabetis insulíndepen**de**n

dent inclouen (de major a menor risc) persones amb an
ticossos pancreàtics, bessons monocigòtics d'un diabèt
tic insulíndependent i fills de diabètics insulínde
pendents amb HLA idèntic, haploíndèntic o no idèntic.
El grau de risc per a cadascuna d'aquestes circumstàn
cies encara no està ben establert i més estudis amb
grups de persones d'aquestes característiques serien nece
ssaris.

Anteriorment s'havien emprat els termes prediab
etis i diabetis latent per a descriure la situació
de les persones d'aquest grup. No obstant això, la tol
ererància a la glucosa d'aquestes persones és normal,
i els termes prediabètic i diabètic potencial no són
escaients per les mateixes raons adduïdes al parlar de
les classes: a) tolerància a la glucosa alterada i b)
anormalitat prèvia de la tolerància a la glucosa, fon
amentades sobre tot, en les possibles conseqüències
desfavorables d'etiquetar una persona com a diabètic,
cara al seu futur psicològic*a* i socialment parlant.
Prediabetis pot usar-se exclusivament en un aspecte
retrospectiu, referint-lo al període de vida previ a
la diagnosi de diabetis.

2.3. INVESTIGACIÓ BIOLÒGICA DE LA INTOLERÀNCIA A LA GLUCOSA.

2.3.1. Glucosúria.

La presència en l'orina de glucosa en concentracions francament superiors a les fisiològiques, que es troben al voltant de 1,1 mmol/L, és deguda a la incapacitat de les cèl·lules tubulars del ronyó de fosforilar i reabsorbir la glucosa que és filtrada pel glomèrul quan la glucèmia ultrapassa el llindar de reabsorció tubular, que normalment és de 9,9 a 11,0 mmol/L. Algunes vegades, però, aquest llindar és molt més baix i apareix glucosúria en persones que tenen glucèmies normals, situació que s'anomena de glucosúria renal.

Les concentracions de glucosa en orina de pacients hiperglucèmics pot variar de 5,5 a 55,0 mmol/L (Joslin, 1.959).

Aquesta determinació s'utilitza en gran mesura per a l'"screening" d'àmplies poblacions degut a la senzillesa i baix preu. També la utilitzen els pacients amb diabetis manifesta per a portar un autocontrol de

la medicació.

2.3.2. Cetonúria.

L'acidosi cetoacidòtica que es produeix en les diabetis insulínol dependents descompensades pot detectar-se per la presència de cossos cetònics a l'orina, on són excretats en grans quantitats, fins i tot abans d'eleva-se considerablement en la sang (Stone, 1.970). Per això és molt extesa la investigació de la presència de cossos cetònics en orina per a detectar possibles diabetis descompensades (Gordon, 1.971). També és útil per a discriminar el coma cetoacidòtic de l'hiperosmolar.

2.3.3. Glucèmia.

La glucèmia sol determinar-se en sang total capil·lar, com s'acostuma a fer als països centroeuropeus, o bé en plasma o sèrum venós, modalitat més extesa als Estats Units i també a casa nostra. Hi ha dos factors que han de tenir-se presents a l'hora d'avaluar els resultats si hom vol que siguin comparables: d'una banda la variació fisiològica arteriovenosa, que pot assolir

importantes diferències postprandials (Lind, 1.973) i d'altre l'analítica sang total-plasma o sèrum (Dillon, 1.965). La interferència que poden causar certes substàncies presents a les hematies i la major significació biològica de la glucosa plasmàtica, ja que la glucosa de les hematies no intervé directament en les reaccions metabòliques de les cèl·lules, fan que sigui preferible la determinació en sèrum o plasma.

La determinació de la concentració de glucosa en sèrum procedent d'una sang extreta estant el pacient en dejú des de vuit a deu hores abans, és la prova més sol·licitada als laboratoris d'anàlisis clíniques. La seva gran importància es deu al fet de que quan s'ultrapassen certs nivells pot donar-se per segura la presència de diabetis mellitus. Segons les recomanacions del National Diabetes Data Group (1.979), quan en una persona la concentració de glucosa sèrica basal excedeix els 7,8 mmol/L en més d'una ocasió, es tractarà d'un cas de diabetis mellitus. Els valors en adults, sense comptar-hi les embarassades, són inferiors a 6,4 mmol/L. En els casos en què la concentració estigui compresa entre 6,4 i 7,8 mmol/L caldrà practicar una prova d'estimulació per a resoldre l'am

bigüitat. Aquestes xifres es basen en determinacions efectuades per qualsevol dels següents mètodes: Hexoquinasa, glucosa oxidasa, o-toluidina, Somogy-Nelson, ferricianur i neocuproïna (aquests dos darrers aplicats a l'Autoanalyzer). S'han de fer notar que la pretesa equivalència d'aquests mètodes és molt qüestionable i d'altra banda no es donen dades sobre la imprecisió analítica de les determinacions que han donat lloc a l'establiment dels esmentats límits.

La determinació de la glucèmia post-prandial, a les dues hores, aproximadament, d'haver pres un menjar ric en hidrats de carboni, té una sensibilitat diagnòstica més gran que la glucèmia basal, ja que pot detectar casos d'intolerància a la glucosa en què no s'altera la glucèmia basal. Per tant tindria un interès més gran cara l'"screening". No obstant això, la manca de normalització fa que no es pugui avaluar d'una manera adequada. En general es considera que la glucèmia postprandial a les dues hores d'haver menjat ha de ser igual o inferior a la basal. En tot cas, davant de resultats anòmals cal una confirmació mitjançant una prova normalitzada.

2.3.4. Prova de tolerància a la glucosa oral.

El procediment per a la pràctica de la prova de tolerància a la glucosa oral recomenat per la American Diabetis Association (Klimt, 1.969), semblant al de la British Diabetic Association (Fitzgerald, 1.964), va ser adoptat per el National Diabetes Data Group en les seves recomanacions de l'any 1.979, amb un únic canvi, consistent en què la dosi de glucosa prescrita per a persones adultes no embarassades passava a ser de 75 g (1,75 g/kg de massa corporal ideal pels nens, fins a un màxim de 75 g). Aquesta dosi era un compromís entre els 50 g àmpliament usats a Europa i els 100 g, més freqüents als Estats Units.

Diversos factors impulsaren aquesta recomanació: En primer lloc, semblava extremadament desitjable l'assoliment d'una estandardització internacional en la pràctica de la prova de tolerància a la glucosa oral. En segon lloc, un important nombre de centres de recerca ja usaven aquesta quantitat de 75 g de glucosa. En tercer lloc, s'havia comunicat que una dosi de 50 g no és prou provocativa per a detectar alguns casos, en els quals pot detectar-se intolerància a la glucosa amb dosis més altes, mentre que una dosi de 100 g pot causar nàusea. Finalment, s'ha mostrat que les dife

rències en els nivells de glucosa plasmàtica durant la prova de tolerància són virtualment independents de la dosi, en subjectes normals. Les diferències no són significatives, en absolut, entre dosis de 75 i 100 g. En persones amb tolerància a la glucosa alterada poden donar-se diferències importants, de fins a 2,7 mmol/L en la glucèmia a les dues hores, segons que la dosi sigui de 50 o 100 g.

La prova de tolerància a la glucosa oral només pot practicar-se a pacients altrament sans i ambulatoris i que no prenguin drogues que puguin interferir amb les determinacions de glucosa, tant des del punt de vista biològic com de l'analític. La prova s'ha de practicar al matí, després de tres dies de dieta sense restriccions i en la que entrin almenys 150 g de carbohidrats. Durant aquest període s'ha de portar una activitat física normal. El pacient ha d'estar en dejú des d'almenys deu hores abans, però no més de setze. Es permet prendre aigua durant aquest període. Cal que estigui assegut durant el transcurs de la prova i que s'abstingui de fumar.

Després de practicar una extracció en dejú, s'ad

ministra la glucosa en una concentració no més gran de 25 g/dL en aigua aromatitzada, que s'ha de beure en aproximadament cinc minuts. Quan es comença a beure es posa el temps a zero i llavors s'han d'obtenir mostres de sang cada mitja hora, durant dues hores.

Per a dones embarassades, els criteris d'interpretació dels resultats requereixen que la dosi sigui de 100 g de glucosa i que les extraccions es practiquin en intervals de 1 hora, durant tres hores (O'Sullivan, 1.964).

Si és possible, les mostres cal que siguin de sang venosa i recollides en tubs que continguin un conservador que eviti la glucòlisi.

La interpretació dels nivells de glucosa plasmàtica en dejú i durant la prova de tolerància s'han basat en criteris diversos; West enumera, almenys, 17 criteris per a interpretar la prova de tolerància a la glucosa (West, 1.978). D'aquests, els que s'han aplicat amb més freqüència són els de la Public Health Service dels Estats Units (Remein, 1.961), els de Fajans i Conn (Fajans, 1.965), els de la British Diabetic Asso

ciation (Fitzgerald, 1.964), i els de l'Organització Mundial de la Salut (Expert Committee on Diabetes Mellitus, World Health Organisation, 1.965). En general, els valors que impliquen diagnòstic de diabetis són unes concentracions de glucosa plasmàtica superiors a 10,0-10,8 mmol/L a l'hora, i a 7,8-8,9 mmol/L a les dues hores. No obstant això, proves que resulten patològiques per uns criteris, són normals per a altres, donant com a conseqüència una gran variabilitat en les estimacions sobre la prevalència de la diabetis (Kobberling, 1.970).

En general no existeix una línia de divisió clara entre els nivells de glucosa plasmàtica basal, i en el curs de la prova de tolerància a la glucosa, dels subjectes diabètics i els dels no diabètics. Amb rares excepcions, la distribució de freqüències en la majoria de les poblacions mostra una distribució contínua unimodal, asimètrica en els nivells més alts (Gordon, 1.964); cap característica d'aquesta corba no permet distingir els diabètics dels normals. En canvi, els indis americans i algunes poblacions micronèsiques (Bennet, 1.976) (Zimmet, 1.978), sí que exhibeixen una distribució bimodal entre no diabètics, en els quals els

nivells de glucosa plasmàtica a les dues hores és inferior a 11,1 mmol/L, i diabètics, en els que la glucosa plasmàtica a les dues hores és superior a 13,3 mmol/L. La mateixa distribució bimodal existeix per a la glucosa plasmàtica basal, en què un valor d'aproximadament 7,8 mmol/L divideix les dues modes. Com que en les altres poblacions aquesta bimodalitat no es dona, s'ha hagut de prendre una decisió arbitrària, fonamentada en criteris estadístics (Fajans i Conn), de consens de grups d'experts (Public Health Service, USA) (Organització Mundial de la Salut) o estudis prospectius a llarg termini amb extracció de conclusions provisionals (British Diabetic Association).

En el seu informe el National Diabetes Data Group intentà recopilar totes les dades disponibles, elaborant les següents recomanacions:

El terme diabetis mellitus s'aplicarà a les persones que compleixin, almenys, una de les condicions,

1. Síntomes manifestos de diabetis i hiperglucèmia inequívoca.

2. Nivells basals de glucosa plasmàtica superiors a 7,8 mmol/L, en més d'una ocasió.

3. Nivells de glucosa plasmàtica en la prova de tolerància a la glucosa oral que excedeixin els 11,1 mmol/L, tant a les dues hores de l'administració de la dosi de glucosa com en qualsevol punt temporal comprès entre les 0 i les 2 hores, en més d'una ocasió.

Es considera que tenen tolerància a la glucosa alterada els casos en què es donin totes les següents condicions:

1. Nivells basals de glucosa plasmàtica inferiors a 7,8 mmol/L.

2. Els nivells de glucosa plasmàtica dels punts temporals compresos entre els 30 i els 90 minuts, inferiors a 11,1 mmol/L.

3. Els valors de la glucosa plasmàtica a les dues hores, inferiors a 11,1 mmol/L però superiors a 7,8 mmol/L.

Quan es tracta de població infantil les condicions per a considerar que existeix una intolerància a la glucosa són només dues,

1. Concentració de glucosa sèrica en condicions basals inferior a 7,8 mmol/L.

2. Concentració de glucosa sèrica a les dues hores superior a 7,8 mmol/L.

Es considerarà que la tolerància a la glucosa és normal quan es compleixi,

1. Concentració de glucosa sèrica en condicions basals inferior a 6,4 mmol/L.

2. Concentració de glucosa sèrica a les dues hores inferior a 7,8 mmol/L.

3. Concentració de glucosa sèrica entre els 30 i els 90 minuts inferior a 11,1 mmol/L.

Per a la població infantil queden reduïdes a dues,

1. Concentració de glucosa sèrica en condicions basals inferior a 7,2 mmol/L.

2. Concentració de glucosa sèrica a les dues hores inferior a 7,8 mmol/L.

Per a dones embarassades continuen considerant-se vigents els criteris de O'Sullivan (O'Sullivan, 1.964), segons els quals es classifica com a diabetis gestacional els casos en què dos o més valors ultrapassin els següents límits,

1. Concentració de glucosa sèrica en condicions basals, 5,8 mmol/L.

2. Concentració de glucosa sèrica al cap d'una hora de la ingestió de 100 g de glucosa, 10,6 mmol/L.

3. Concentració de glucosa sèrica a les dues hores de la ingestió de 100 g de glucosa, 9,2 mmol/L.

4. Concentració de glucosa sèrica al cap de tres hores de la ingestió de 100 g de glucosa, 8,1 mmol/L.

Aquests criteris han de ser considerats, tal

com diuen els propis autors més com una base de treball que no pas quelcom definitiu. Encara que presos en conjunt són vàlids per a la majoria de casos, no deixen d'existir algunes situacions ambigües (Kobberling, 1.979).

En la reunió celebrada l'any 1.979 a Zagreb per l'European Association for the Study of Diabetes, va proposar-se una certa variant dels criteris del National Diabetes Data Group segons els quals es definia com a:

1. Diabetis mellitus, quan les concentracions de glucosa sèrica en condicions basals i a les dues hores de la ingestió de 75 g de glucosa excedissin els 7,8 i 11,0 mmol/L, respectivament.

2. Tolerància a la glucosa alterada, quan la concentració de glucosa sèrica en condicions basals fos inferior a 7,8 mmol/L i a les dues hores de la ingestió de 75 g de glucosa superior a 7,8 mmol/L però inferior a 11,0 mmol/L.

Aquests criteris són més restrictius que els

del National Diabetes Data Group basant-se en el fet de que el diagnòstic de diabetis mellitus ha d'ésser inequívoc (Keen, 1.979).

2.3.5. Altres proves per a avaluar la tolerància a la glucosa.

En el transcurs del temps han estat descrites un bon nombre de proves alternatives o complementàries a la prova de sobrecàrrega oral. Encara que puguin presentar alguns avantatges, com ara una sensibilitat més gran, els criteris actuals de diagnosi només tenen en compte la prova oral, com s'ha vist abans. No obstant això, degut a la notable difusió que han tingut es descriuen i discuteixen succintament en aquest text.

2.3.5.1. Prova de tolerància a la glucosa per via venosa.

Després d'administrar 25 g glucosa per via intravenosa s'efectuen diverses extraccions de sang a temps cronometrat, determinant-se la concentració de glucosa sèrica de cada mostra. En un paper semilogarítmic s'expressen els valors de les glucoses sèriques en

front del temps. La gràfica resultant ha de ser una recta, de la qual es calcula el pendent i en funció d'aquest s'avalua la tolerància a la glucosa.

La seva pràctica, normalment, es destina a la investigació o bé en casos de pacients amb trastorns gastrointestinals que interfereixen l'absorció normal de glucosa. Entre els avantatges d'aquesta prova pot esmentar-se que evita variables pròpies de l'absorció gastrointestinal, s'avalua amb un sol número (el pendent de la recta), té una durada més curta que la prova oral i s'eviten les sensacions de nàusea. Els seus principals inconvenients són que la prova intravenosa és menys fisiològica que l'oral, ja que la ruta oral és la normal per a l'entrada d'aliments, estimulants-se la secreció d'algunes hormones gastrointestinals que al seu torn tenen un efecte altament significatiu en la secreció i l'acció de la insulina. D'altra banda, aquesta prova és menys sensible que la de sobrecàrrega oral per a detectar moderades intoleràncies a la glucosa.

2.3.5.2. Prova intravenosa de la tolbutamida.

Després de la injecció intravenosa de tolbuta-

mida ha de produir-se un descens de la concentració de glucosa sèrica, ja que s'estimula la secreció d'insulina. Quan el descens és inferior a un 23% al cap de mitja hora, pot sospitar-se l'existència d'una diabetis. La principal aplicació d'aquesta prova és la discriminació de les intoleràncies a la glucosa que no alteren la secreció insulínica, com ara les hepatopaties de la diabetis mellitus primària.

2.3.5.3. Prova de tolerància a la cortisona-glucosa.

Prèviament a la prova de sobrecàrrega oral de glucosa o a la prova intravenosa de tolerància a la glucosa s'administra cortisona. Això permet detectar respostes anormals en persones que no les presentarien sense la potenciació de la cortisona.

2.3.6. Insulina sèrica.

Les concentracions d'insulina sèrica en condicions basals són francament disminuïdes en les diabetis insulíniques. En canvi, no hi han diferències notables entre les de les persones normals i les dels pacients amb diabetis no insulínica de

qualsevol grau d'intensitat (Bagdade, 1.967). En els obesos s'observa una hiperinsulinèmia constant (Bagdade, 1.971).

Les determinacions d'insulina, junt amb les de glucosa, en el curs de la prova de tolerància a la glucosa oral, s'han proposat com una manera de millorar el valor diagnòstic de la mateixa. Els valors s'han expressat de nombroses maneres, com ara la relació insulina/glucosa (Chiles, 1.970) o bé la relació increments de glucosa/increments d'insulina (Danowski, 1.973). En els pacients amb diabetis benigna la resposta insulínica a la sobrecàrrega oral de glucosa és superior a la de les persones normals, però els índexs insulinogènics, que són els quocients entre els sumatoris dels increments d'insulina i els increments de glucosa, són inferiors (Seltzer, 1.967).

La prova de sobrecàrrega de glucosa amb determinació de nivells d'insulina no ha estat gaire emprada, segurament degut al cost de la realització de nombroses determinacions d'insulina i a la dificultat en la interpretació de les dades obtingudes (Howanitz, 1.979), entre altres coses per la heterogeneïtat de la diabe-

tis mellitus en quant a la resposta insulínica (Fajans, 1.979).

2.3.7. Hemoglobina glucosilada.

L'anàlisi de l'hemoglobina dels eritròcits adults normals posa en evidència un cert nombre de fraccions menors. Així, doncs, en una electroforesi en tampó acetat a pH 6,2 es separa l'hemoglobina A en cinc fraccions menors amb mobilitats diferents. Entre aquestes fraccions pot identificar-se l'hemoglobina A_{1c} que representa d'un 3 a un 6 % de l'hemoglobina total. En alguns diabètics la taxa d'hemoglobina A_{1c} augmenta d'una manera significativa, podent arribar a representar un 18 % (Dolhofer, 1.978). L'hemoglobina A_{1c} difereix de l'hemoglobina A₁ degut a una glucosilació de la cadena beta a nivell de la resta valina de l'extremat N-terminal. Aquesta glucosilació no necessita la intervenció d'enzims i pot realitzar-se "in vitro" incubant hemoglobina normal en presència de glucosa. La funció aldehid d'aquest glúcid es condensa amb la funció amina de la valina per a formar una base de Schiff, amb una posterior transformació d'Amadori que aconduïx a un lligam estable (Figura 2.4.) (Burr, 1.976).

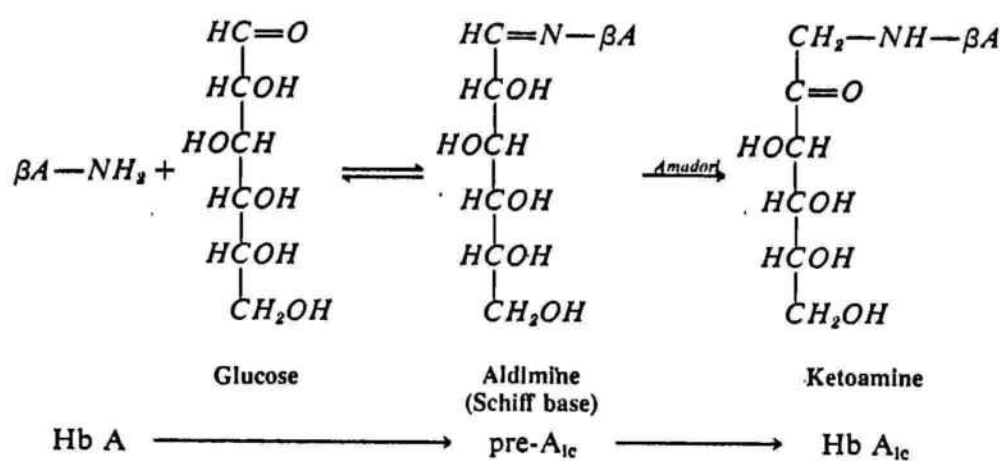


Figura 2.4. Glucosilació d'una molècula d'hemoglobina.

La reacció transcorre molt més depressa si hom substi tueix la glucosa per glucosa 6-fosfat, fructosa 6-fos fat, fructosa 1,6-difosfatogliceraldehid 3-fosfat. A a quests intermediaris de la glucòlisi donarien lloc a la formació d'altres hemoglobines menors (Stevens, 1.977)

En un subjecte normoglucèmic la glucosilació es realitza lentament. Un eritròcit jove no conté hemo globines glucosilades. Aquestes apareixen al llarg de la vida de l'eritròcit, que per terme mig és de 120 dies, d'una manera progressiva. En el cas d'un estat hiperglucèmic, la concentració de glucosa a l'interior dels eritròcits augmenta sensiblement, car en aquestes cèl.lules la insulina no controla el pas de glucosa a través de la membrana. Així, doncs, la concentració intraeritrocitària de glucosa depèn de la concentració de la glucosa plasmàtica i per tant la formació d'hemo globines glucosilades és més ràpida com més elevada si gui aquesta. D'aquesta manera la concentració d'hemo globina A_{1c} és funció de la glucèmia mitjana en perio des bastant llargs d'aproximadament dues o tres setmanes. D'aquí vé que a través de la taxa d'hemoglobina gluco silada puguin quantificar-se les hiperglucèmies perllon gades amb molta eficàcia (Gonen, 1.977).

Cal remarcar que la majoria de les complicacions de la diabetis (angiopaties, nefropaties i neuropaties) es donen en teixits insulino-independents i que per tant reaccionen com els eritròcits a la hiperglucèmia. Per això s'espera que la glucosilació de pèptids pugui aportar en el futur algun aclariment a la connexió de l'etiologia de les esmentades complicacions.

Quan una molècula d'hemoglobina es glucosila en l'extremitat N-terminal d'una cadena beta esdevé inaccessible a la modulació de la seva afinitat per l'oxigen en funció de les variacions de la concentració de 2-3 difosfoglicerat. Malgrat això, no s'ha vist que aquest fenomen tingués cap repercussió de tipus patològic degut, probablement, al fet de que àdhuc en els diabètics més mal controlats queda almenys un 85% d'hemoglobina funcional.

La determinació de l'hemoglobina A_{1c} pot efectuar-se per cromatografia d'intercanvi iònic, isoelectrofocalització o cromatografia líquid-líquid. També s'han presentat tècniques simplifiades de cromatografia en columna en què es valora el conjunt de les hemoglobines A_{1a1} , A_{1a2} , A_{1b} i A_{1c} . Com que la fracció

A_{1c} és molt més gran que les altres sembla que aquesta determinació conjunta pot substituir amb eficàcia la de l'hemoglobina A_{1c} individualitzada (Trivelli, 1.971).

3. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA DE L'ENZIMO IMMUNOANÀLISI HETEROGÈNIA.

3.1. INTRODUCCIÓ

Les anàlisis immunològiques van substituïnt ràpidament altres mètodes usats per a detectar o quantificar substàncies amb importants propietats biològiques o farmacològiques. Els elevats nivells de sensibilitat i especificitat assolits per aquest tipus de proves són conseqüència de l'alta afinitat i especificitat de la unió reversible d'antigens a anticossos i de l'existència de mètodes de conjugació dels antigens o anticossos amb marcadors amb gran sensibilitat per a ser detectats (isòtops radiactius, fluoròfors, ferritina, radicals lliures, bacteriòfags i enzims). Encara que els isòtops radiactius siguin els marcadors més correntment usats, les immunoanàlisis que utilitzen enzims estan en contínua expansió.

Entre les primeres aplicacions dels enzims com a marcadors es troba l'ús de conjugats enzim-anticòs per a detectar i localitzar components cel·lulars antigènics per microscopia (Avrameas, 1.976). Després l'ús de conjugats enzim-anticòs i enzim-antigen va extendre's a diverses immunoanàlisis (Engvall, 1.971), (van Weemen, 1.971).

Les enzimoimmunoanàlisis (EIA) es classifiquen en dos grups principals:

1) EIA heterogènies en les quals, l'antigen o anticòs marcats amb un enzim que queden en excés, es separen del complex enzim-antigen-anticòs abans de la mesura de l'activitat enzimàtica.

2) EIA homogènies, en les quals l'activitat enzimàtica de l'antigen marcat es mesura en presència del complex anticòs-antigen marcat que té la part enzimàtica inhibida estèricament.

El principi ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) és una enzimoimmunoanàlisi heterogènia, basada en els mateixos principis de la radioimmunoanàlisi (RIA). La diferència més important entre ELISA i RIA és que en la primera s'utilitza un enzim com a marcador de l'antigen o anticòs, mentre que en la segona és un isòtop radioactiu. Igual com en la RIA on l'antigen o anticòs marcat que no forma complex es separa del que l'ha format, l'ELISA inclou una separació del complex d'antigen i anticòs marcat enzimàticament de l'anticòs o antigen marcat enzimàticament que es trobi lliure.

L'activitat enzimàtica de la fracció unida o de la fracció lliure es quantifica per la conversió, catalitzada per l'enzim, d'un substrat relativament no cromàtic o no fluorescent en un producte altament cromàtic o fluorescent.

El mètode ELISA té alguns avantatges sobre la RIA. Els isòtops usats amb més freqüència en la RIA són el I^{125} i el I^{131} que tenen vides mitjanes curtes i que quan s'incorporen a diverses substàncies poden destruir les estructures moleculars amb les seves desintegracions radioactives. A més a més, l'execució de la RIA requereix precaucions especials degut al risc que per a la salut suposen els materials radioactius. Els materials marcats enzimàticament no són peril·losos, tenen una vida més llarga i donen lloc a un efecte d'amplificació gràcies a la propietat dels enzims de renovar els substrats sobre els que actuen. No obstant això, una de les limitacions de les tècniques ELISA rau en la relativa manca de control de les reaccions d'acoblament dels enzims marcadors, comparades amb els procediments de marcatge radioisotòpic. A més a més, la purificació d'una substància marcada amb un enzim moltes vegades és difícil o bé poc pràctica (Wisdom, 1.976), (Voller, 1.978), (O'Sullivan, 1.979), (Oellerich, 1.980).

3.2. CLASSIFICACIÓ DE LES TÈCNIQUES ELISA.

A continuació es dóna una breu descripció de les diferents variants de les tècniques basades en el principi ELISA. Les diverses proves s'han classificat com competitives o no competitives (immunoenzimomètriques) depenent de si ha un pas de la reacció en el qual un antigen unit a un enzim o lligat a una fase sòlida competeixen per un determinat nombre de llocs d'enllaç de l'anticòs, o bé si l'antigen o anticòs que ha de mesurar-se es deixa que reaccioni amb un excés de reactiu immunològic, quantificant-se després l'abast de la reacció antigen-anticòs (Clark, 1.980).

3.2.1. Proves competitives amb conjugat antigen-enzim.

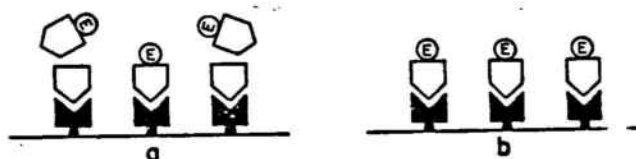
En aquesta tècnica (Figura 3.1) la primera operació és l'acoblament físic o químic d'un anticòs a una fase sòlida (pas1). Després de rentar l'anticòs en excés (pas 2) s'incuba amb una solució que conté una quantitat fixa d'antigen marcat enzimàticament en presència d'antigen no marcat procedent d'un estàndard o una mostra problema (pas 3a) o bé en absència del mateix (pas3b). Aquesta mescla conté un agent humectant

1. Fixació de l'anticòs a la fase sòlida.



2. Rentat.

3. Incubació amb antigen marcat amb enzim en presència (a) o absència (b) d'estàndard o mostra continent antigen.



4. Rentat

5. Incubació amb substrat (o) i mesura del producte (●).

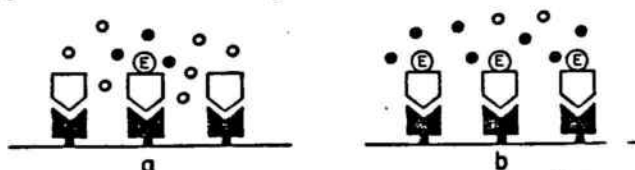


Figura 3.1. ELISA competitiu emprant conjugat antigen-enzim i anticòs immobilitzat.

per a disminuir l'adsorció inespecífica del conjugat antigen-enzim a la fase sòlida. Després d'una incubació a temperatura constant fins que s'assoleixi l'equilibri i un rentat amb l'agent humectant s'incuba a temperatura constant amb substrat enzimàtic (pas 5). Llavors, la reacció enzimàtica es para i la concentració del producte es determina per colorimetria o fluorimetria. Les concentracions de producte mesurades són inversament proporcionals a les concentracions d'antigen de l'estàndard o de la mostra problema.

3.2.2. Proves competitives amb conjugat anticòs-enzim.

En aquesta altra mena d'ELISA competitiu s'empra anticòs marcat amb enzim i l'antigen està acoblat a una fase sòlida. Apart d'aixó és molt semblant al mètode anterior.

3.2.3. Proves no competitives intervenint-hi un sol lloc antigènic.

Aquestes tècniques són, de fet, variants de les anteriors. Hi han dos tipus principals, un dels quals utilitza antigen conjugat amb enzim. En comptes d'incu

bar antigen marcat i antigen no marcat junts amb anticòs unit a la fase sòlida, els estàndards i les mostres problema s'incuben amb un lleuger excés d'anticòs immobilitzat. Després de rentar, un excés d'antigen marcat amb enzim es deixa reaccionar amb els llocs de l'anticòs que han quedat lliures. A partir d'aquí el procediment és idèntic al descrit en 3.2.1. L'altre tipus es diferencia per emprar anticòs marcat. Els estàndards i problemes s'incuben amb un excés moderat d'anticòs marcat i un cop assolit l'equilibri la mescla de reacció s'afegeix a un excés d'antigen immobilitzat que elimina l'excés d'anticòs marcat. Igual com en els casos anteriors la concentració del producte de la reacció catalitzada per l'enzim és inversament proporcional a la concentració d'estàndard o problema. En ambdós tipus, la segona incubació amb excés de reactiu ha de ser prou curta perquè el complex antigen-anticòs format a la primera incubació no es dissocia significativament. Això exigeix l'ús d'anticòssos amb elevada afinitat.

3.2.4. Proves no competitives intervenint-hi dos llocs antigènics.

En aquest tipus d'ELISA no competitiu, anomenat també entrepà ("sandwich"), un excés d'anticòs immobilitzat s'incuba amb l'antigen que forma part de la mostra o l'estàndard (Figura 3.2, pas 3). Després de rentar el complex antigen-anticòs immobilitzat s'incuba amb un excés d'anticòs marcat que es lliga a un dels llocs antigènics que quedaven lliures (pas 5). Una altra alternativa és que el segon anticòs no sigui marcat i aquest es faci reaccionar amb un tercer anticòs marcat, específic per a la IgG de l'espècie animal de la que s'havia obtingut el segon anticòs. En ambdues variants la concentració del producte de la reacció catalitzada per l'enzim (pas 7) és directament proporcional a la concentració de l'antigen determinat a la mostra problema o l'estàndard.

3.2.5. Proves per a mesurar anticossos.

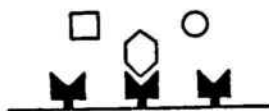
Aquest tipus d'ELISA no competitiu, utilitzat per a determinar la concentració d'anticossos, es basa en l'ús d'antigen immobilitzat i un segon anticòs, marcat enzimàticament, dirigit contra la IgG humana.

1. Fixació de l'anticòs a la fase sòlida.



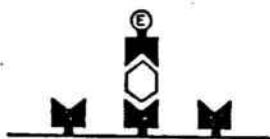
2. Rentat.

3. Incubació amb mostra contenint antígen.



4. Rentat.

5. Incubació amb conjugat anticòs-enzim.



6. Rentat.

7. Incubació amb substrat (o) i mesur del producte (●).

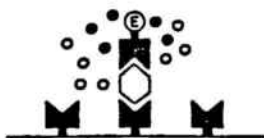


Figura 3.2. ELISA en "sandwich" per a determinar antigens.

3.3. CARACTERÍSTIQUES BÀSIQUES DE DISSENY.

Com en tota anàlisi immunològica el factor més important de tots és el poder disposar d'anticossos o/ i antigens amb un elevat grau d'afinitat i especificitat. A part d'això, l'elecció d'un enzim per a fer de marcador i la conjugació del mateix amb el reactiu immunològic, són factors decisius en tota enzimoinmunològica anàlisi. Si aquesta es tracta d'una tècnica ELISA cal tenir en compte, també, la necessitat de lligar antigen o anticòs a una fase sòlida que serveixi per a immobilitzar-lo.

3.3.1. Selecció de l'enzim.

La sensibilitat d'una anàlisi enzimoinmunològica depèn de l'efecte amplificador impartit per la part enzimàtica de la molècula de conjugat. Els enzims usats en la preparació del conjugat haurien d'acomplir les següents condicions per a obtenir una tècnica sensible, practicable i poc cara:

1. L'enzim hauria de ser estable a 25 i 37 °C,

així com tenir una estabilitat d'almenys 6 mesos a 4 °C.

2. L'enzim purificat hauria de ser assequible comercialment i relativament poc car.

3. L'activitat enzimàtica hauria de poder-se mesurar mitjançant tècniques colorimètriques o fluorimètriques.

4. Caldria que petites quantitats d'enzim fossin detectables. Per això, l'enzim hauria de tenir una alta capacitat de transformació de substrat i el producte de la reacció una absorbabilitat o fluorescència molt gran.

5. Per a les tècniques d'ELISA competitiu, l'enzim no s'hauria de veure afectat pels components biològics de la mostra analitzada.

Els enzims que compleixen d'una manera més satisfactòria aquests requeriments, essent per tant els més emprats en tècniques ELISA, són la fosfatasa alcalina d'intestí de vedell, la peroxidasa de rave i la beta-

D-galactosidasa d'Escherichia coli (Clark, 1.980).

3.3.2. Acoblament d'enzims marcadors a antigens o anticossos.

El marcatge de proteïnes i haptens amb enzims proporciona la possibilitat de mesurar substàncies que es troben a concentracions molt baixes, gràcies a l'efecte multiplicador que té l'activitat catalítica dels enzims. És important, per raons òbvies, que al provocar la unió l'enzim no ha de perdre activitat. També s'ha d'evitar un canvi en l'estructura de les altres proteïnes que pogués modificar les seves determinants immunològiques, és a dir la capacitat de reconèixer o ésser reconegudes.

3.3.2.1. Enllaços Enzim-Proteïna.

Aquest tipus d'enllaços es constitueixen entre dues proteïnes, ja que l'enzim ho és també. Per tant un dels més grans obstacles és la formació d'enllaços de molècules d'enzim o de l'altre proteïna entre sí. També cal evitar la formació de productes polimeritzats, poc susceptibles d'originar immunoanàlisis sensi

bles.

3.3.2.1.1. Mètode del glutaraldehyd.

Els dos grups aldehyd terminals del glutaraldehyd poden lligar-se als grups amino lliures de les proteïnes mitjançant la formació d'una base de Schiff (Avarameas, 1.969).

A) Procediment en una etapa.- En aquest procediment es posen en contacte l'enzim i la segona proteïna en presència de glutaraldehyd que serveix de pont. Normalment s'utilitza per a unir I_gG amb fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa i lactoperoxidasa. Aquest mètode dóna un rendiment bastant baix degut a la formació d'agregats d' I_gG .

B) Procediment en dues etapes.- La peroxidasa de rave no reacciona amb el glutaraldehyd, probablement degut a un bloqueig d'alguns dels seus grups amino per part d'isocianats d'alquil presents al rave (Nahdme, 1.974). Per això en aquest procediment es fa reaccionar l'enzim amb glutaraldehyd, per activar-lo, eliminant després l'excés de glutaraldehyd. L'enzim acti-

vat es fa reaccionar amb una I_gG .

3.3.2.1.2. Mètode del periodat.

Aquest mètode sobretot s'utilitza per a acoblar peroxidasa de rave a proteïnes de pes molecular elevat. Es fonamenta en la presència de grups oligosacàrids en la peroxidasa de rave, que poden ser oxidats mitjançant periodat a aldehids. Aquests poden reaccionar amb grups amino lliures de la segona proteïna per a donar bases de Schiff.

3.3.2.1.3. Mètode dels compostos bifuncionals.

Les maleïmides reaccionen de manera ràpida i selectiva, en condicions suaus, amb molècules que contenen grups sulfhidril. Aquests grups poden ser introduïts a les molècules que no en tenen per mercaptosuccinilació o reducció de ponts disulfur.

A) 4 NN'-O-Fenilendimaleïmida.

És un compost homobifuncional ja que té els dos grups actius iguals. Uneix proteïnes i enzims que tinguin grups sulfhidril ambdós.

B) m-Maleïmidobenzoił-N-hidroxisu cinimida (MBS).

És un compost heterobifuncional j que els dos grups actius són diferents. Només una de les dues proteïnes a unir ha de tenir grups sulfhidr l. Això minimitza molt l'autopolimerització, essent n mètode més simple i amb més rendiment que l'anterior .

3.3.2.1.4. Enllaços no covalents.

Poden utilitzar-se anticossos híb ids capaços d'unir-se per un punt a la molècula que a a determinar-se i per l'altre a l'enzim marcador.

3.3.2.2. Enllaços enzim-haptè.

Els mètodes per enllaçar enzims a b haptens no són bàsicament diferents dels utilitzats per a enllaçar proteïnes, si bé s'ha de tenir en cc pte que les modalitats poden ser més grans degut a l gran variabilitat d'haptens. Cal evitar el lligam de l'enzim a cen tres amb activitat antigènica, ja que ai ò reduiria l'avidesa de l'anticòs per l'haptè marcat D'altra banda cal que el lligam sigui diferent de l usat per a u

nir l'haptè amb la proteïna portadora immunògena. Si s'emprés el mateix pont, aquest podria ser reconegut per l'anticòs i en conseqüència l'haptè marcat no estaria en les mateixes condicions que l'haptè lliure per a reaccionar.

3.3.2.2.1. Mètode de l'anhídrid mixt.

Es basa en una reacció entre un haptè amb un grup carboxil i un halogenur d'acil, formant-se un anhídrid. La posterior addició de la proteïna dóna lloc a una amida que uneix l'enzim i l'haptè.

3.3.2.2.2. Mètode de la carbodiïmida.

La reacció entre un haptè amb carboxils terminals i la carbodiïmida, amb posterior substitució de la mateixa per la proteïna que va a lligar-se a l'haptè, és el fonament d'aquest procediment.

3.3.2.2.3. Mètode dels imidats bifuncionals.

Els imidats bifuncionals poden unir-se a un haptè que tingui grups amino lliures i posteriorment a l'enzim d'idèntica manera, actuant així com a pont.

3.3.3. Immobilització d'antígens i anticossos en una fase sòlida.

Si bé s'han utilitzat diversos materials com a fase sòlida per a immobilitzar antigens o anticossos, els més corrents són plàstics, segurament per motius comercials degut a la seva disponibilitat. L'absorció de les proteïnes al plàstic es basa en forces febles, generalment de naturalesa física. No obstant això, s'han proposat alternatives per a aconseguir enllaços covalents, molt més estables.

3.3.3.1. Unió mitjançant forces físiques.

Es basen en la simple absorció de la proteïna a la superfície de poliestirè o "nylon" o polivinil. L'inconvenient més greu és la feblesa d'aquesta unió que pot donar lloc a un desacoblament quan es produeix en operacions de rentat per a eliminar l'excés d'anticòs o antigen marcats. Per això resulta important que s'utilitzi una solució de rentat adequada i que es fa ci servir el nombre òptim de vegades. Un altre inconvenient és la dificultat de trobar una concentració homogènia d'antigen o anticòs, sobre tot en lots dife

rents. Això dificulta l'estandardització (Lehtonen(1), 1.980).

3.3. 3.2 Unió per enllaços covalents.

S'han proposat alguns mètodes d'enllaç covalent que solucionarien els problemes creats per la feblesa de l'atracció física simple. Un d'ells consisteix en paper activat amb bromocianogen que es diu que té més capacitat d'unió per superfície de fase sòlida, així com més homogeneïtat entre diferents lots. No obstant això, la tècnica analítica és més laboriosa que les usuals (Lehtonen(2), 1.980).

També s'ha descrit l'ús d'un "nylon" tractat amb àcid clorhídric durant un període de temps limitat diverses vegades, fins a provocar una hidròlisi parcial que origina grups amino i carboxil lliures, útils per a formar enllaços covalents amb proteïnes si s'utilitzen reactius bifuncionals adequats (Handry, 1.980).

4 MATERIAL I MÈTODES.

4.1. SUBJECTES ESTUDIATS.

Un total de 240 persones constituïren el material humà de la tesi. D'acord amb llurs històries clíniques varen ser classificats en tres grups (Quadre 4. I), cadascun dels quals es dividí en dos, un amb els no obesos i l'altre amb els obesos.

Es considerà obesa aquella persona que tingués una massa corporal superior en un 20% a la que li correspondria per la seva alçada segons la Society of Actuaries dels Estats Units (Quadre 4.II) (National Diabetes Data Group, 1.979).

Tots els subjectes que varen entrar a l'estudi eren de raça blanca i vivien a la comarca del Barcelonès. No s'hi inclogué cap dona embarassada.

4.1.1. Subjectes normals (N).

Constituïren un grup de 66 persones no obeses i un altre de 17 persones obeses. La glucosa sèrica era en tots els casos inferior a 6,4 mmol/L, límit superior de la normalitat, segons els criteris del NDDG

Requeriment
d'insulino-
terapia

Tolerància a Signes clínics de
la glucosa diabetis mellitus

Grup Nombre Homes Dones Edat X s

No obesos

N	66	37	63	32	12	Normal	NO	glucosa basal > 7,8 mmol/L	NO
DMNID	42	39	61	45	15	Alterada	SI o/i	glucosa 120 min > 11,0 mmol/L	NO
TGA	70	48	52	47	12	Alterada	NO		NO

Obesos

N	17	35	65	33	12	Normal	NO		NO
DMNID	17	51	49	46	16	Alterada	SI o/i	glucosa basal > 7,8 mmol/L glucosa 120 min > 11,0 mmol/L	NO
TGA	28	43	57	48	16	Alterada	NO		NO
Total	240	subjectes							

QUADRE 4.I. Subjectes estudiats classificats en diferent grups: N=normal; DMNID= diabetis mellitus no insulínodendent; TGA= tolerància a la glucosa alterada. Es consideren obesos els qui tenen una massa corporal superior en un 20% a l'optima en funció de l'alçada.

<u>Alçada en metres</u>	<u>Massa corporal ideal en kg</u>	
	<u>Homes</u>	<u>Dones</u>
1,45		46,0
1,48		46,5
1,50		47,0
1,52		48,5
1,54		49,5
1,56		50,4
1,58	55,8	51,3
1,60	57,6	52,6
1,62	58,6	54,0
1,64	59,6	55,4
1,66	60,6	56,8
1,68	61,7	58,1
1,70	63,5	60,0
1,72	65,0	61,3
1,74	66,5	62,6
1,76	68,0	64,0
1,78	69,4	65,3
1,80	71,0	
1,82	72,6	
1,84	74,2	
1,86	75,8	
1,88	77,6	
1,90	79,3	
1,92	81,0	

QUADRE 4 II. Relació de la massa corporal amb l'alçada per a una constitució corporal mitjana, recomanat en les Conferències on Obesity (1.973 i 1.978) per la Society of Actuaries, Fogarty International Center, National Institutes of Health dels Estats Units.

(National Diabetes Data Group, 1.979), i els valors de la prova oral de tolerància a la glucosa estaven dintre dels marges normals, aplicant els criteris de Fajans-Conn (Fajans, 1.971). En cap cas no s'havia presentat mai cap símptoma característic de la malaltia, ni es coneixien antecedents familiars.

En el grup format per no obesos la mitjana de les edats fou de 32 anys, amb un interval de 15 a 65. La distribució per sexes fou 37 % el masculí i 63% el femení.

En el grup format per obesos la mitjana de les edats fou 33 anys amb un interval de 23 a 65. La distribució per sexes fou 35% el masculí i 65% el femení. Llurs masses corporals eren d'un 21% a un 91% superiors a les ideals en funció de l'alçada, amb una mitjana del 48%.

4.1.2. Subjectes amb tolerància a la glucosa alterada (TGA).

Constituïren un grup de 70 persones no obeses i un altre de 28 persones obesos. Cap d'elles no pre-

sentava símptomes clínics de diabetis mellitus, però estaven sota vigilància mèdica ja que se'ls havien trobat uns nivells de glucosa sèrica superiors als normals i/o valors alterats en la prova oral de tolerància a la glucosa, segons els criteris de Fajans-Conn.

En el grup format per no obesos la mitjana de les edats fou de 47 anys, amb un interval de 25 a 80. La distribució per sexes fou 48% el masculí i 52% el femení.

En el grup format per obesos la mitjana de les edats fou de 48 anys amb un interval de 19 a 78. La distribució per sexes fou 43% el masculí i 57% el femení. Llurs masses corporals eren d'un 22% a un 73% superiors a les que els correspondria per l'alçada, amb una mitjana del 39%.

4.1.3. Subjectes amb diabetis mellitus no insulíndependent (DMNID).

Constituïren un grup de 42 persones no obeses i un altre de 17 persones obeses, pacients del Servei d'Endocrinologia de l'Hospital de la Creu Roja de l'Hos

pitalet de Llobregat. S'els havia diagnosticat una diabetis no insulíndependent en funció de la tolerància a la glucosa, dels símptomes clínics o d'ambdues coses. Se seguiren uns criteris basats en les recomanacions del NDDG (National Diabetes Data Group, 1.979) i els presentats a la reunió de Zagreb de l'EASD (Keen, 1.979) que s'aplicaren de la següent manera:

a) Per les històries clínicus podia descartar-se una associació amb síndromes diferents de la diabetis mellitus, amb les que es pogués establir alguna relació etiològica.

b) No se'ls havia instaurat terapèutica insulíinica, ni es preveia aquesta possibilitat a curt termiini. D'altra banda no havien presentat mai nivells anormals de metilcetona en sang o orina.

c) Un 20% dels subjectes no obesos i un 28% dels obesos s'inclogueren en la categoria de diabètics peruquè tenien unes concentracions de glucosa sèrica superiiors a 7,8 mmol/L en condicions basals i a 11,0 mmol/L als 90 i 120 minuts de la ingesta de 75 g de glucosa, malgrat no presentar símptomes característics de diabe

tis mellitus. Aquest és el grau d'intolerància a la glucosa suficient per a considerar diabètic un subjecte que no presenta símptomes clínics, segons els criteris de l'EASD presentats a la reunió de Zagreb. La resta dels pacients, a més d'intolerància a la glucosa, presentaven algun d'aquests símptomes: Retinopatia comprovada per angiografia, macroangiopatia causant d'infart de miocardi, pruríja vulvar i ulceració del peu.

En el grup format per no obesos la mitjana de les edats fou de 45 anys amb un interval de 20 a 73. La distribució per sexes fou 39% el masculí i 61% el femení.

En el grup format per pacients obesos la mitjana de les edats fou de 45 anys amb un interval de 22 a 71. La distribució per sexes fou 51% el masculí i 49% el femení. Llurs masses corporals eren d'un 23% a un 68% superiors a les que els correspondria per l'alçada, amb una mitjana del 39%.

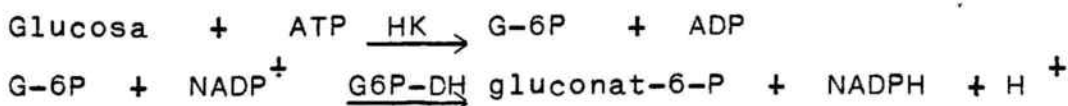
4.2. METODOLOGIA ANALÍTICA.

Per a poder desenrotllar la tesi fou necessària l'aplicació de tècniques d'anàlisi química i al mateix temps tractar les dades obtingudes mitjançant mètodes estadístics adequats.

4.2.1. Determinació de glucosa en sèrum (glucosa (S)).

Les determinacions de glucosa en sèrum sanguini s'efectuaren pel mètode de la hexoquinasa que és el més específic dels disponibles actualment, havent estat proposat com a mètode de referència (Passey, 1.977).

La tècnica es basa en l'acció dels enzims hexoquinasa (HK, EC 2.7.1.1.) i glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (GGP-DH, EC 1.1.1.49). El primer fosforila la glucosa per a donar glucosa-6-fosfat que al seu torn és oxidada per la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa per a donar 6-fosfogluconolactona, actuant el NADP com a acceptor d'hidrogen. El NADPH format es correspondrà, mol per mol, amb la glucosa present a la mostra.



La concentració de NADPH es mesura colorimètricament a una longitud d'ona de 340 nm un cop la reacció ha quedat completada. El NADP en excés que quedi sense reduir-se no pot interferir, ja que no és capaç d'absorbir radiacions d'aquesta longitud d'ona.

Com a instrument analític es va utilitzar un analitzador automàtic ABA-100 (Abbot Laboratories, Diagnostics Division, South Pasadena, Califòrnia). Es tracta d'un analitzador monocanal discret, amb sistema òptic bicromàtic. L'aparell està dissenyat de manera que la cèl.lula fotoelèctrica rebi, alternativament, raigs lluminosos de dues longituds d'ona diferents. En una d'elles la substància mesurada presenta una absorció màxima. L'altra cau fora del pic de l'espectre d'absorció de la substància mesurada, però en canvi pot restar a dins dels d'altres substàncies que podrien causar interferències. En el mòdul de comandament de l'aparell es resten automàticament els valors de les dues absorbències, amb la qual cosa l'absorbència resultant serà més específica. D'aquesta manera es disminueixen interferències del tipus de la causada per la terbolesa dels sèrums hiperlipídics.

S'utilitzaren els següents reactius, corresponents al "kit" Gluco-quant^R (Boehringer Mannheim, referència 158 062):

A) Tampó NADP/ATP

tampó de de fosfat. . . 0,07 mmol/L, pH 7,8

Mg SO₄ 4 mmol/L

NADP 1,5 mmol/L

ATP 1,4 mmol/L

B) Solució enzimàtica

glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa 1,25 mkat/L

hexoquinasa 2,08 mkat/L

C) Reactiu de treball

Dissoldre reactiu B en reactiu A, en una proporció 1/101. Estable 3 dies a 4 °C.

D) Estàndard de glucosa.

Precimat^R glucosa, 5,55 mmol/L.

Els espècimens analitzats foren sèrums obtinguts pel procediment descrit en 4.3.2.

La regulació de l'aparell fou la següent:

Interruptor intern (FRR)	normal
Posició del fotòmetre	normal
Filtres	340/380
Plat de dilució	1:101
Temperatura	37 °C
Selector de mode	End point
Temps d'anàlisi	5 min
Direcció de la reacció	UP
Revolucions del carrusel	2
Zero	0000
Decimals	00.00
Factor de calibració	càlcul a partir de l'estàndard

El control de la imprecisió i la inexactitud va efectuar-se mitjançant sèrums liofilitzats i valorats de DADE (DADE Division, American Hospital Supply Corporation, Miami, Florida), als següents nivells:

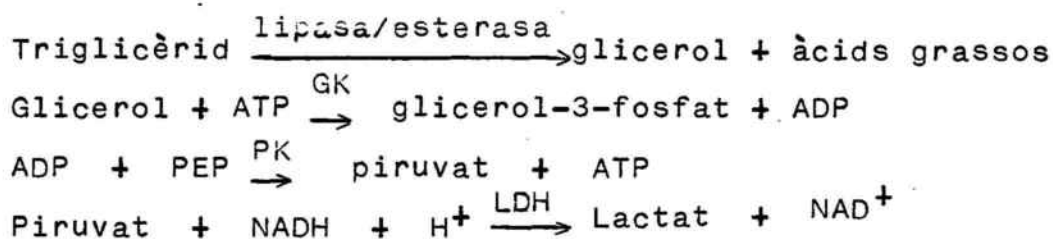
Nº de lot	Valor mitjà	Marge de confiança
Monitrol IR LTD-160	6,0 mmol/L	5,6-6,5 mmol/L
Monitrol IIR PTD-59	12,9 mmol/L	12,2-13,7 mmol/L

4.2.2. Determinació de triglicèrid en sèrum.

El triglicèrid es va determinar per un mètode completament enzimàtic amb lectura a l'ultravioleta proper (Wahlefeld, 1.974). Aquesta tècnica es basa en la determinació del glicerol procedent de la hidròlisi enzimàtica del triglicèrid sèric. Al mateix temps, també es determina el glicerol endogen, però aquest té una concentració pràcticament constant, que es considera de 0,11 mmol/L.

En la primera fase, un complex enzimàtic format per lipasa d'origen bacterià (E C 3.1.1.3) i esterasa de fetge de porc (E C 3.1.1.1.) s'encarrega de l'escissió del triglicèrid en glicerol i àcids grassos. En la reacció iniciadora l'enzim gliceroquinasa (GK, EC 2.7.1.30) catalitza la fosforilació del glicerol amb consum d'ATP i rendiment d'ADP. En la reacció auxiliar l'ADP capta una molècula de fosfat del fosfoenolpiruvat, que es converteix en piruvat en una reacció catalitzada per l'enzim piruvatoquinasa (PK, EC 2.7.1.40). La reacció indicadora consisteix en la reducció del piruvat per NADH, gràcies a l'acció de l'enzim lactatodeshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27).

La seqüència de reaccions pot esquematitzar-se de la següent manera:



Per a cada mol de glicerol present en desapareixerà un altre de NADH.

Com a instrument analític s'utilitza, igual com per a la glucosa, l'ABA-100 (veure 4.2.1), emprant el dispositiu de lectura a la primera volta (FRR), que permet mesurar l'increment de l'absorbància des de l'inici de la reacció fins als cinc minuts del mateix.

S'utilitzaren els següents reactius, corresponents al "kit" Test-Combination^R Triglycerides (Boehringer Mannheim, referència 126 012), que un cop barrejats donaven un "monoreactiu" de treball, estable tres hores a temperatura ambient, amb la següent composició:

tampó de fosfat	48 mmol/L
albúmina bovina	2 g/L
sulfat de magnesi	3,8 mmol/L
dodecil hidrogen sulfat sòdic	0,34 mmol/L
NADH	0,2 mmol/L
ATP	3,0 mmol/L
fosfoenolpiruvat	0,35 mmol/L
lactatodeshidrogenasa	100 ukat/L
piruvatoquinasa	16,6 ukat/L
lipasa	1,28 ukat/L
esterasa	10,0 ukat/L

Com a estàndard s'utilitza Precimat[®] Glicerol amb un valor de 2,29 mmol/L (Boehringer Mannheim, referència 166 588).

La regulació de l'aparell fou la següent:

Interruptor intern	FRR
Posició del fotòmetre	normal
Filtres	340/380
Plat de dilució	1:51
Temperatura	37 °C
Mode d'operació	Rate

Temps d'anàlisi	5 min
Direcció de la reacció	DOWN
Revolucions del carrusel	2
Zero	-500
Decimals	00.00
Factor de calibració	calculat a partir de l'estàndard

Amb aquesta programació el que es mesura és la cinètica de la desaparició del NADH, ja que en cinc minuts la reacció encara no s'ha acabat.

Dels resultats obtinguts es restà el valor constant de 0,11 mmol/L, atribuïble al glicerol lliure.

Igual com en el cas de la determinació de glucosa el control de la imprecisió i la inexactitud va realitzar-se amb sèrums liofilitzats de DADE, amb els següents valors:

	Nº lot	Valor mitjà	Marge de confiança
Monitrol I	LTD-160	1,24 mmol/L	1,05-1,43 mmol/L
Monitrol II	PTD-59	2,15 mmol/L	2,00-2,31 mmol/L

4.2.3. Determinació de la fracció d'hemoglobina glucosilada.

S'aplicà la tècnica de cromatografia d'intercanvi iònic, mètode molt utilitzat per a separar substàncies estructuralment similars.

Els reactius, que formaven part del "kit" Bio-Rad Hemoglobin A₁ by Column Test^R (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califòrnia), foren els següents:

A) Reactiu d'hemòlisi.

Èter polioxietilènic, solució aquosa al 0,33% v/v.

B) Reactiu eluent-revelador.

Tampó de fosfat pH 6,7

Cianur potàssic 0,01 mmol/L

C) Columnes cromatogràfiques.

Columnes de polipropilè, emplenades amb resina d'intercanvi catiònic, dèbilment àcida.

(NOTA: El fabricant no facilita més dades sobre

la composició d'aquests reactius).

La metòdica seguida fou la següent:

1. 100 ul de sang total es barregen amb 500 ul de reactiu hemolitzant (reactiu A), deixant-se 10 minuts a temperatura ambient, en els que es lisen les hematies i l'hemoglobina és alliberada.

2. Un alíquota de 100 ul de la sang hemolitzada és dipositada damunt la resina (reactiu B), llençant-se el líquid de drenatge.

3. Un cop la columna ha quedat completament drenada se li afegeixen 10 mL d'eluent-revelador (reactiu B), que actua convertint la metahemoglobina en cianmetahemoglobina i simultàniament, separant el component ràpid, format per les fraccions A_{1a,b,c} de la resta. L'eluït es recull en tubs de vidre i s'homogeneïtza per inversió.

4. Una alíquota de 20 uL de sang hemolitzada es barreja amb 10 mL de l'eluent-revelador (reactiu B).

5. Es mesuren les absorbàncies de les solucions

obtingudes en els passos 3 i 4, a una longitud d'ona de 415 nm. El percentatge d'hemoglobina A₁ que forma part de l'hemoglobina total es calcula aplicant la fórmula:

$$\frac{\text{Absorbància solució 3}}{5 \times \text{Absorbància solució 4}} \times 100 = \% \text{HbA}_1$$

Els especímens analitzats foren sangs totals obtingudes pel procediment descrit en 4.3.2.

Donada la gran influència que la temperatura té sobre els resultats obtinguts per aquest mètode (Dix, 1.978), va comprovar-se que la temperatura dels reactius i de la cambra on es realitzava la prova fos en tot moment de 25 °C.

L'instrumental emprat fou el següent:

Fotòmetre Vitatron RRP (Vitatron Scientific, Dieren, Holanda), equipat amb microcubeta de succió.

Pipetes mecàniques Cappilettor^R (Labora Mannheim, Mannheim, República Federal d'Alemanya) per a 20 i 100 µL.

Pipetes volumètriques de vidre (Proton, Barcelona).

El control de la imprecisió va realitzar-se de terminant cada vegada una mostra del dia anterior, atès que l'estabilitat de les mostres és de 7 dies a 4-6 °C. D'aquesta manera pot avaluar-se la imprecisió intersèrie sense necessitat de disposar de materials de control més estables (Fuentes, 1.982).

4.2.4. Determinació d'insulina sèrica per radioimmunoanàlisi (insulina (S)).

La concentració d'insulina en una mostra problema es valora per la capacitat de competir amb una quantitat fixa d'insulina marcada amb un isòtop radioactiu tot lligant-se a anticossos antiinsulina, els quals estan units per enllaços covalents a partícules de Sephadex que actuen com a fase sòlida. Aquesta capacitat competitiva es compara amb la d'una solució estàndard d'insulina (Velasco, 1.973).

S'utilitza el "kit" Phadebas Insulin Test^R (Phar

macia AB, Uppsala, Suècia), amb els següents reactius:

A) Complexe Sephadex-Antiinsulina.

B) Insulina-¹²⁵I.....800 ng/L -1,11 Bq/L

C/ Solució tamponada de pH 7,4.

E) Estàndard d'insulina.

No es varen emprar els de l'equip sinó els mateixos que es feren servir en l'enzimoinmunoanàlisi (4.2.5 reactiu G).

S'utilitzà el següent instrumental:

Comptador de radiacions gamma Wilj. Wilj Electronics, Ltd. Ashford, Kent, Regne Unit.

Centrífuga Labofuge III, Heraeus Christ GmbH, Osterode am Harz, República Federal d'Alemanya

Pipetes mecàniques Cappilettor^R per a 100 uL

Trompa d'aigua per a aspiració de líquids.

Se seguí la següent metodologia:

1. Pipetejar 100 uL de les diferents solucions estàndard a tubs de centrífuga, per duplicat.

2. Pipetejar 100 uL de sèrum problema o control, per duplicat, a una altra sèrie de tubs de centrífuga.

3. Pipetejar 100 uL de solució d'insulina marca da (reactiu B), a tots els tubs i, a més a més, a uns altres dos tubs addicionals, els quals es tapen i es deixen separats. Aquests tubs serviran per a mesurar l'activitat total i no s'han d'incubar ni rentar.

4) Pipetejar 1,0 mL de suspensió de complex Sephadex-Antiinsulina (reactiu A) a cada tub, agitant contínuament.

5) Incubar a 4-5 °C de 12 a 16 hores, mantenint els tubs tapats.

6) Centrifugar a 2000 x g durant dos minuts. Treure els taps i repetir la centrifugació. Aspirar el sobrenedant fins aproximadament 5 mm del fons del tub.

7) Rentar les partícules afegint 2 mL de solució de clorur sòdic 154 mmol/L, centrifugant i aspirant com abans. Aquest pas es repeteix tres vegades.

8) Determinar la radioactivitat de cada tub.

9) Construir una gràfica de calibració en la que figurin en ordenades (escala decimal) el percentatge de radioactivitat dels estàndards respecte els blancs i en abscisses (escala logarítmica) els valors de les concentracions d'insulina dels estàndards. Per interpolació es trobaran les concentracions dels problemes.

4.2.5. Determinació d'insulina per enzimoimmunoanàlisi (insulina (S)).

Per a la determinació de la insulina sèrica s'utilitzà una tècnica basada en el principi ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), descrita per Kleinhammer (Kleinhammer, 1.976) i comercialitzada per Boehringer Mannheim.

Varen introduir-se algunes variants al mètode, en funció dels resultats de l'estudi d'algunes característiques del mateix (4.3.1). Així s'obtenia un marge de mesura més ampli que evitava l'haver de repetir un considerable nombre de determinacions en sèrums que tinguessin nivells d'insulina més alts que el límit su

perior del marge de mesura que era de 840 pmol/L en la tècnica original. El mètode es basa en la fixació, en una primera incubació, de la insulina present al sèrum analitzat o solució estàndard a anticossos anti Insulina lligats a la paret interior de tubs de poliestirè. Després es fa una saturació seqüencial dels llocs que han quedat lliures en la primera incubació mitjançant una segona incubació amb un conjugat d'insulina i peroxidasa de rabe (EC 1.11.1.7). Com més alta sigui la concentració d'insulina en el sèrum o estàndard, menys molècules de conjugat insulina-peroxidasa quedaran fixades per l'antiInsulina. Per tant, mesurant l'activitat peroxidàsica pot comparar-se la concentració d'insulina dels sèrums problema amb la dels estàndards.

Els reactius utilitzats foren els següents:

A) Tub de poliestirè, cilíndric, de 10 mm de diàmetre i 40 mm d'altura, recoberts per la cara interior amb fracció gamma-globulina d'antisèrum antiInsulina de conill porquí. Formaven part del "kit" Enzy-mun-Test^R Insulina (Boehringer Mannheim, referència 199 648).

B) Solució de conjugat insulina-peroxidasa de rave obtingut pel mètode de l'oxidació de residus de sacàrid amb per-iodat i formació d'una base de Schiff (Nakane, 1.974), purificat posteriorment per cromatografia d'intercanvi iònic. La solució, un cop preparada, tenia la següent composició:

tampó de fosfat 40 mmol/L, pH 6,8
 albúmina bovina 2,5 g/L
 peroxidasa de rave250 nkat/L
 Formava part del "kit" Enzymun-Test^R Insulina.

C) Solució de substrat cromogen, tamponada a pH 5,6 amb tampó fosfat-citrat. Estava formada per solució aquosa de les següents substàncies:

peròxid d'hidrogen (Merck referència 8597) 8,8 mmol/L
 diclorur d'ortofenilendiamina (Merck, referència 7242)
 77,3 mmol/L
 di-sodihidrogenofosfat (Merck referència 6589)
 232 mmol/L
 àcid cítric (Merck referència 241)..... 84 mmol/L

D) Tampó de fosfat, pH 6,8, 40 mmol/L. Formava

part del "kit" Enzymun-Test^R Insulina.

E) Insulina liofilitzada en un vial amb 1 mg d'albúmina humana. (Novo Research Institute, Bagsvaerd, Dinamarca, referència 400). Cada vial conté 100 ug (17,22 nmol) d'insulina monocomponent humana. La reconstitució s'efectua amb 1,0 ml d'aigua destil·lada. A partir d'aquesta solució mare es prepararen les diferents solucions estàndard de treball.

F) Tampó de fosfat per a preparar les solucions estàndard, preparat mitjançant solució aquosa de les següents substàncies:

di-sodi hidrogenofosfat 2-hidrat (Merck referència 6580).....	32,4 mmol/L
sodi di-hidrogenofosfat 1-hidrat (Merck referència 6346)	0,8 mmol/L
albúmina humana, puríssima (Behringwerke, AG, Marburg República Federal d'Alemanya, referència RHA-21)60 g/L	
clorur sòdic (Merck referència 6404)...	102,7 mmol/L

El pH de la solució està comprès entre 7,3 i 7,5.

G) Solucions estàndard de treball. Es prepararen a partir de la solució mare d'estàndards (reactiu E), diluint amb tampó d'estàndard (reactiu F) en les següents proporcions:

200 uL de reactiu E + 100 mL de reactiu F = 34,4 nmol/L
300 uL de 34,4 nmol/L + 6,6 mL de reactiu F = 1563 pmol/L
300 uL de 34,4 nmol/L + 9,7 mL de reactiu F = 1033 pmol/L
500 uL de 34,4 nmol/L + 24,5 mL de reactiu F = 689 pmol/L
5,0 mL de 689 pmol/L + 5,0 mL de reactiu F = 344 pmol/L
1,0 mL de 689 pmol/L + 9,0 mL de reactiu F = 51 pmol/L

Així, doncs, resultà una col·lecció de solucions estàndard de treball a les següents concentracions : 1563, 1033, 689, 344 i 51 pmol/L.

H) Sèrum per al control de la imprecisió, obtingut a partir d'un "pool" de sèrums, ben homogeneïtzat i filtrat, separat en alíquotes conservades a -20 °C en tubs Eppendorff de polipropilè, perfectament tapats. D'entre els sèrums barrejats n'hi havia que provenien de la prova d'estimulació, a fi i efecte que la concentració total estigués en la zona intermèdia de la gràfica de calibració.

I) Àcid sulfúric, aproximadament 2,5 mol/L

Diluir 25,5 mL d'àcid sulfúric (Merck referència 732) amb aigua destil·lada fins a un volum final de 100 mL .

L'instrumental emprat fou el següent:

Fotòmetre Vitatron RRP.

Pipetes mecàniques Cappilettor^R per a 100 uL.

Dispensador mecànic Seripettor^R (Labora Mannheim) per a 1,1 mL (0,5-2,0 mL).

Bomba d'aigua per a aspiració de líquids.

Flascó rentador emplenat amb aigua corrent de l'aixeta.

Cronòmetre.

La pauta de treball seguida fou la següent:

1) Pipetejar 100 uL de les solucions estàndard de treball (reactiu G) i dels sèrums problema a tubs amb antiinsulina (reactiu A) convenientment identificats. Diluir amb 1,1 mL de tampó de fosfat (reactiu D) No cal agitar. Tapar els tubs amb Parafilm^R (American

Can Company, Greenwich, Estats Units) i deixar-los de 16 a 24 hores a una temperatura compresa entre els 2 i els 8 °C.

2. Evacuar la fase líquida per aspiració. Rentar amb aigua corrent de l'aixeta, a una temperatura de 2 a 8 °C, emprant el flascó rentador. Evacuar aquesta aigua per aspiració fins a completa sequetat.

3. Dispensar 1,0 mL de solució de conjugat (reactiu B). Tapar els tubs amb Parafilm^R i deixar-los dues hores a una temperatura compresa entre 2 i 8 °C.

4. Repetir el pas 2.

5. Dispensar a cada tub 1,0 mL de solució de substrat-cromogen (reactiu C) a intervals cronometrats. Als 30 minuts del començament, pipetejar 100 uL d'àcid sulfúric 2,5 mol/L (reactiu I) respectant els mateixos intervals d'abans. Agitar amb el Capilettor^R amb el que s'efectua el pipeteig.

6. Efectuar la lectura colorimètrica a 492 nm.

7. Amb els parells de valors concentració-absorbància dels estàndards efectuar un ajust per mínims quadrats a una corba logarítmica ($y = a + b \ln x$), en la que x representa les concentracions i y les absorbàncies corresponents. Substituint els valors de les absorbàncies donades pel sèrum problema, poden aïllar-se les respectives concentracions d'insulina.

Els càlculs matemàtics descrits en el pas 7 s'efectuaren mitjançant una calculadora programable HP-97 (Hewlett-Packard, Corvallis, Oregon Estats Units), utilitzant el programa "curve fitting" dissenyat pel fabricant.

En cada sèrie de determinacions va incloure's, juntament amb els problemes, una alíquota del "pool" de sèrums per a l'avaluació de la imprecisió (reactiu H).

Les determinacions, tant d'estàndards com de controls, s'efectuaren per duplicat, emprant-se la mitjana de les dues absorbàncies.

4.2.6. Càlcul de l'índex d'eficàcia diagnòstica diferencial.

Eficàcia diagnòstica és un terme que engloba els conceptes de sensibilitat i especificitat (Galen, 1.980).

La sensibilitat d'una prova diagnòstica, expressa la capacitat de no donar negatius falsos. Pot calcular-se mitjançant la fórmula,

$$S = \frac{PC}{PC + FN}$$

en la qual S és la sensibilitat, PC el nombre de positius certs i FN el nombre de negatius falsos. En definitiva, aquest valor indica la proporció de les persones que patint la malaltia estudiada donen un resultat positiu amb la prova en qüestió, la qual serà més sensible com més a prop de 1'1 estigui el valor S.

L'especificitat d'una prova diagnòstica expressa la capacitat de no donar falsos positius. Pot calcular-se mitjançant la fórmula,

$$E = \frac{NC}{NC + FP}$$

en la qual E és l'especificitat, NC el nombre de negatius certs i FP el nombre de falsos positius. En definitiva, aquest valor és la proporció de persones que no pateixen la malaltia i donen resultat negatiu de la prova en qüestió, la qual serà més específica com més a prop de l'1 estigui el valor de E. L'eficàcia diagnòstica d'una prova analítica expressa la capacitat de no donar falsos positius ni falsos negatius. Pot calcular-se mitjançant la fórmula,

$$ED = \frac{PC + NC}{P + N}$$

en la qual ED és l'eficàcia diagnòstica, PC nombre de positius certs, NC el nombre de negatius certs, P el nombre total de positius i N el nombre de negatius. Cal remarcar que el denominador $P + N$ equival al nombre total de subjectes estudiats. En definitiva, aquest valor és la proporció de subjectes en els que el resultat de la prova ha reflectit llur realitat fisiopatològica. Com més a prop de l'1 estigui el valor de ED, més vàlida serà la prova per a diferenciar els individus afectats per la malaltia dels qui no ho són.

Aquestes definicions, que són útils per a enten

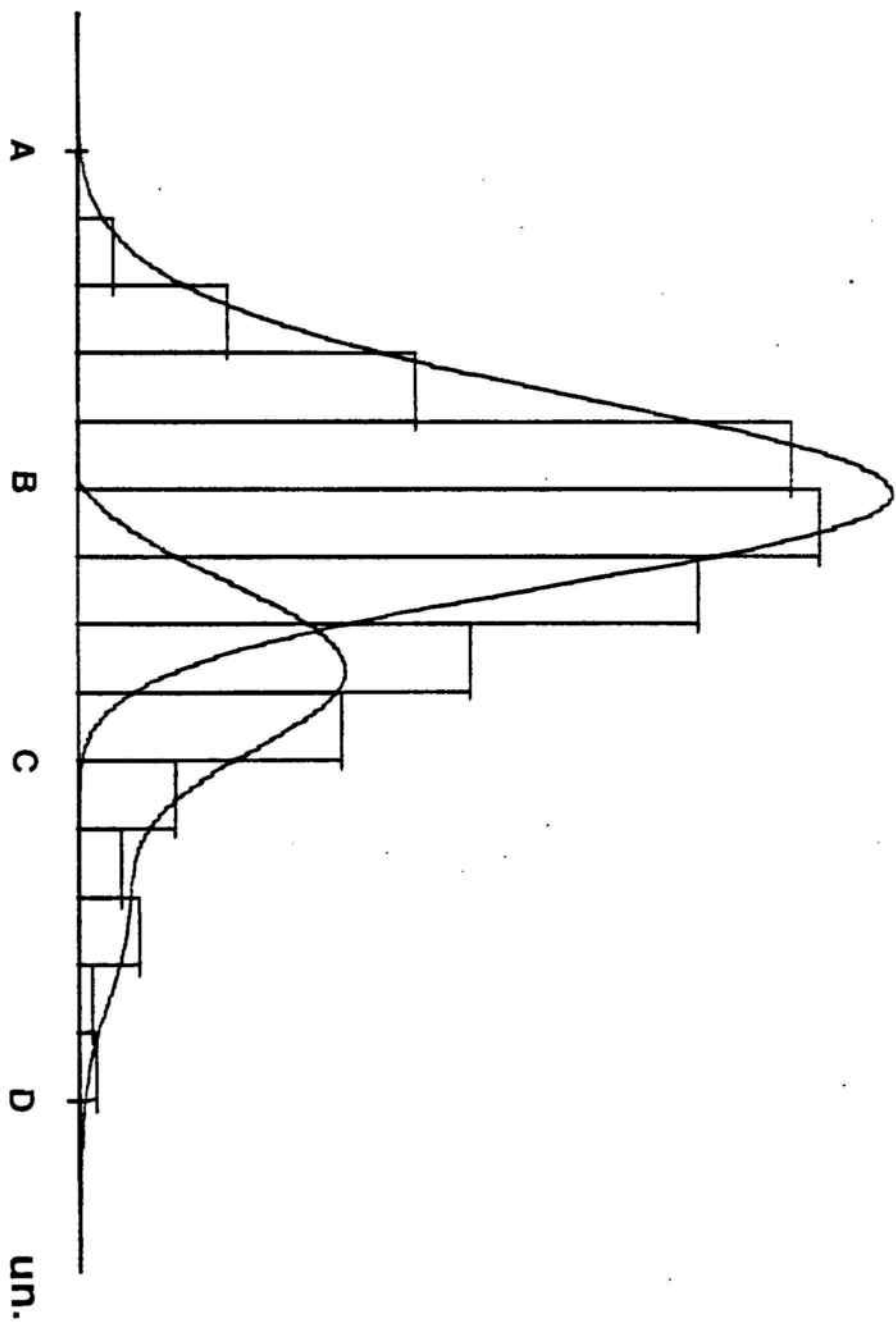
dre els conceptes, cauen en la simplificació de considerar només la dicotomia positiu-negatiu, sense tenir en compte la possibilitat d'obtenir valors quantitatius, amb la corresponent variabilitat biològica i analítica.

Si hom representa la distribució de freqüències de la població afectada per la malaltia i de la no afectada per la mateixa, respecte un paràmetre quantitatiu (Figura 4.1.), és normal que hi hagi una zona d'intersecció. Els valors englobats en aquesta zona d'intersecció són ambigus pel que fa al seu valor semiològic. Pot establir-se una frontera arbitrària entre positius i negatius, en funció de les necessitats. Si convé evitar falsos negatius s'augmentarà la sensibilitat a expenses de l'especificitat mentre que si es volen evitar falsos positius caldrà incrementar l'especificitat a costa de perdre sensibilitat.

El mètode seguit per a conèixer l'eficàcia diagnòstica de les proves bioquímiques quantitatives per a diferenciar subjectes pertanyents a dues poblacions diferents des del punt de vista nosològic, va consistir en considerar negatius i positius certs només a -

Figura 4.1. Distribució de freqüències de les poblacions normal i patològica respecte els valors d'un paràmetre bioquímic expressats en qualsevol unitat (un.). El 95 % de la població normal té uns valors compresos entre A i C, mentre el 95 % de la patològica els té compresos entre B i D.

NOMBRE DE SUBJECTES



quells valors col.locats fora de la zona d'intersecció. S'aplicà la fórmula per al càlcul de la ED amb els següents criteris:

A) Paràmetres en què els valors augmenten en situacions patològiques.

Negatius certs: valors corresponents a individus del grup que no pateix la malaltia, inferiors al percentil 2,5 dels del grup que la pateix.

Positius certs: valors corresponents a individus del grup que pateix la malaltia, superiors al percentil 97,5 dels del grup que no la pateix.

B) Paràmetres en què els valors disminueixen en situacions patològiques.

Negatius certs: valors corresponents a individus del grup que no pateix la malaltia, superiors al percentil 97,5 dels del grup que la pateix.

Positius certs: valors corresponents a individus del grup que pateix la malaltia, inferiors al percentil

2,5 dels del grup que la pateix.

En tots els grups s'eliminaren prèviament els valors aberrants de la següent manera (Dixon, 1.953):

Si hom representa per $a_1, a_2, \dots, a_n$ els valors d'un paràmetre, ordenats de menor a major per a un grup determinat, s'exclogueren els valors extrems quan les diferències $a_n - a_{n-1}$ o $a_2 - a_1$ resultaven superiors a $a_n - a_1 / 3$.

La prova amb un valor de ED més alt és més eficaç per diferenciar els individus de les dues poblacions, considerant-se de més eficàcia diagnòstica diferencial.

4.2.7. Mètodes estadístics (Schwartz, 1.975).

Per a comparar dos grups amb dades independents, compostos per un nombre igual o superior a trenta efectius s'utilitzà la prova t de Student. Quan els efectius eren menys de trenta va aplicar-se la prova U de Mann-Whitney que constitueix una alternativa útil a la prova t quan es volen evitar les suposicions que aque

ta exigeix.

La comparació de dos grups amb dades dependents va fer-se mitjançant la prova t de Student per a valors aparellats quan eren grups amb trenta o més efectius i la prova T de Wilcoxon quan els efectius eren inferiors a trenta.

La dependència entre dues sèries de valors va avaluar-se mitjançant el coeficient de correlació de Pearson.

En tots els casos l'eliminació de valors aberrants s'efectuà mitjançant el mètode de Dixon (1.953).

4.3. DISSENY EXPERIMENTAL.

S'efectuaren dues menes de proves, unes amb la finalitat d'aplicar de manera òptima a aquest estudi la tècnica descrita per Kleinhammer i col.laboradors (Kleinhammer, 1.976) per a determinar la insulina sèrica, basada en el principi ELISA i les altres amb la finalitat d'obtenir dades bioquímiques que permetessin configurar la tesi.

4.3.1. Estudi de la determinació d'insulina per enzimomunoanàlisi.

Varen estudiar-se les característiques d'alguns passos, com ara la cinètica de la reacció catalitzada per l'enzim marcador i la saturació seqüencial, a fi i efecte d'introduir-hi algunes modificacions tendents a eixamplar el marge de mesura de la tècnica. Això es justifica pel fet que les concentracions d'insulina sèrica postestímul poden ser molt elevades i donar una reacció cromogènica amb absorbàncies al marge del gràfic de calibració, la qual cosa obliga a repetir la determinació amb sèrum diluït. Per a conèixer aquestes característiques, així com el model matemàtic al que

es pogués adaptar la gràfica de calibració, i d'altra banda la imprecisió i la inexactitud del mètode, varen dissenyar-se els experiments aquí descrits.

4.3.1.1. Comparació de substrats cromogènics.

En l'enzimoimmunoanàlisi la quantificació de la substància analitzada s'efectua mesurant l'activitat de l'enzim conjugat amb un antigen o un anticòs. Per a conèixer aquesta activitat cal seguir la cinètica d'uns substrats cromogènics, que poden ser diferents per un mateix enzim.

En aquest cas varen estudiar-se les cinètiques de dos sistemes de substrat i cromogen, utilitzant-se els següents reactius:

A. Tubs de poliestirè amb antiinsulina. Veure la descripció en 4.2.5.

B. Conjugat insulina-peroxidasa de rave. Veure la descripció en 4.2.5.

C. Solució cromogènica amb ortofenilendiamina.

Veure la descripció en 4.2.5.

D. Solució cromogènica amb la següent composició:

di-amoni 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 sulfonat) (ABTS).....	14	mmol/L
perborat sòdic	1,47	mmol/L
tampó fosfat/citrat pH 5,0	100	mmol/L

Aquest reactiu forma part del "kit" Enzimun-Test^R Insulina (Boehringer Mannheim referència 199 648)

Per les dosificacions s'utilitzà material volu mètric de vidre (Proton, Barcelona).

L'experiment va consistir en incubar 1 ml de conjugat (reactiu B) en 6 tubs amb antiinsulina (reactiu A) durant dues hores a 8 °C. Un cop acabada la incubació va aspirar-se el contingut dels tubs mitjançant una bomba de buit. Després es va efectuar un rentat amb aigua corrent de l'aixeta, dosificant-ne aproximadament 1,5 ml a cada tub, essent posteriorment aspirada pel procediment anterior. Llavors es va dosificar 1 ml de solució cromogènica amb ortofenilendiamina (re-

actiu C) a tres dels tubs i 1 ml de solució cromogènica amb ABTS (reactiu D) als altres tres. Als 15, 30 45 i 60 minuts de l'addició de la solució cromogènica es llegiren les absorbàncies, tenint cura de que un cop feta la mesura, la solució tornés immediatament al tub de procedència. Per la mesura fotomètrica s'utilitzà un fotòmetre Vitatron RRP amb microcubeta de quars d'1 cm de pas òptic. Se seleccionaren les longituds d'ona 492 i 405 nm, segons que el cromogen mesurat fos ortofenilendiamina o ABTS, respectivament. La temperatura es mantingué constant a 25 °C.

4.3.1.2. Sensibilitat analítica i linialitat.

Per a veure quina era la mínima quantitat d'insulina susceptible d'ésser detectada pel mètode proposat, va calcular-se la sensibilitat analítica de la tècnica seguint el criteri de Maggio, segons el qual la sensibilitat és la dosi més petita que pot mesurar-se amb un nivell de confiança especificat. Si hom accepta que el soroll de fons del sistema, és a dir, la variabilitat total en la mesura de l'activitat enzimàtica, s'adapta a una distribució gaussiana, llavors la mínima concentració detectable podrà expressar-se en

funció de la desviació estàndard. En aquest cas pot definir-se la mínima concentració detectable com aquella concentració de substància, obtinguda per interpolació en la gràfica dosi-resposta, que correspon a una absorbància dues desviacions estàndard damunt del zero. Aquesta concentració pot distingir-se de zero amb una confiança superior al 95 % (Maggio, 1.980).

La linialitat va determinar-se mitjançant l'observació visual d'una gràfica concentració d'insulina-absorbància, obtinguda analitzant una col.lecció d'estàndards.

Els reactius i instruments foren els descrits en 4.2.5.

La col.lecció d'estàndards es va preparar per successives dilucions de l'estàndard (reactiu E) en so-lució tamponada (reactiu F). Cadascuna de les solucions resultants va diluir-se amb solució tamponada (re-actiu D) en la proporció 1:5. Les concentracions finals varen ser 1,2; 2,9; 14,0; 29,0; 57,0; 115,0 i 172,0 pmol/L.

En tubs recuberts amb antiinsulina (reactiu A) s'incubaren 1,2 ml dels estàndards, per duplicat. Al mateix temps, 1,2 ml de solució tampó (reactiu D) s'incubaren en 30 tubs. Dsprés de deixar-los 16 hores a 8 °C se seguiren els passos 2, 3 i 4 de la tècnica descrita en 4.2.5.

Les mitjanes de les absorbàncies resultants dels dos tubs de cada estàndard serviren per a traçar una gràfica dosi-resposta, en aquest cas concentració d'insulina-absorbància. La interpolació en la gràfica anterior del valor $\bar{x} + 2s$ (mitjana més dues desviacions estàndard) de les absorbàncies resultants dels 30 tubs incubats amb tampó, per la qual cosa podien considerar-se blancs de reactius, va donar la sensibilitat analítica de la tècnica.

4.3.1.3. Sobrecàrrega amb possibles interferents.

Diverses substàncies varen addicionar-se als calibradors per a veure si modificaven la gràfica de calibració. Cadascuna d'aquestes substàncies s'addicionà al tampó dels estàndards (reactiu F, 4.2.5.). donant lloc a sis col.leccions d'estàndards, una per

a cadascuna de les cinc substàncies addicionades i una altra que serví de testimoni. Les substàncies addicionades i llurs respectives concentracions foren:

- Hemoglobina (Fe), procedent d'un lisat d'hematies humanes, valorada pel mètode de la cianmetahemoglobina (Nelson, 1.979)..... 0,25 mmol/L

- Bilirrubina liofilitzada (Laboratoris Knick-erbocker, Barcelona, referència B-230). 150 umol/L

- Àcid úric (Merck, referència 814).. 0,80 mmol/L

- D (+) Glucosa anhidra (Merck referència 8337)
..... 20,0 mmol/L

- Àcid L (+) ascòrbic (Merck referència 127)
..... 5,68 mmol/L

Amb totes les col.leccions d'estàndards es va seguir, pas per pas, la tècnica descrita a 4.2.5.

4.3.1.4. Comparació amb la radioimmunoanàlisi.

Trenta mostres, corresponents a sèrum de sis persones a les qui s'havia practicat la prova de sobre càrrega oral de glucosa amb cinc extraccions de sang, la primera en condicions basals i les altres als 30, 60, 90 i 120 minuts de la ingestió de glucosa, varen valorar-se en paral·lel pel mètode enzimoinmunològic proposat (4.2.5) i per radioimmunoanàlisi (4.2.4). Com que les mostres s'obtingueren en el curs de la prova d'estimulació, hom pogué comptar amb un ampli espectre de concentracions d'insulina sèrica.

4.3.2. Proves bioquímiques practicades.

A totes les persones que constituïren el material humà de la tesi s'els va practicar una sèrie de determinacions a partir de les mostres de sang obtingudes en el curs de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa (Quadre 4.III).

Tots els subjectes, abans que s'els practicqués la prova de sobrecàrrega oral de glucosa, havien seguit durant tres dies un règim alimentari amb un contingut d'almenys 150 g de carbohidrats. Durant una setmana, com a mínim, havien mantingut una activitat fí-

<u>PARÀMETRE</u>	<u>MOSTRA</u>	<u>CONDICIONS</u>	<u>MÈTODE</u>
Glucosa	sèrum	Basal i 30,60,90 i 120 min postglucosa	GOT-PAP
Triglicèrid	sèrum	Basal i 120 min post glucosa	Cinètic UV
Hemoglobina A ₁	sang total	Basal	Cromatografia en columna
Insulina	sèrum	Basal* i 120 min postglucosa	ELISA

QUADRE 4.III Determinacions efectuades amb les mostres obtingudes dels pacients estudiats

*Només en els subjectes obesos

sica normal i s'havien abstingut de prendre medicaments. Se'ls va practicar la prova a les 8 del matí, aproximadament, i estaven en dejú des de les 10 del vespre. La prova de sobrecàrrega va realitzar-se de la següent manera:

- Estant el subjecte dejú, extracció de 20 mL de sang venosa de l'avant braç. La posició era d'estar assegut. Per a provocar l'estasi venosa s'utilitzà un llaç de goma elàstica apropiat.

- Administració per via oral de 75 g de D-glucosa (Merck, referència 814) en aproximadament 250 mL d'aigua corrent de l'aixeta. La ingestió s'havia d'efectuar en cinc minuts com a màxim.

- Als 30 minuts de la ingestió de la glucosa, nova extracció de sang venosa seguint el mateix procediment d'abans, retirant-ne 10 ml.

- Repetició del pas anterior als 60, 90 i 120 minuts de la ingestió de glucosa.

Les mostres de sang, després de ser deixades en

repòs durant una hora a 25 °C aproximadament, se centrifugaren a 3000 x g durant 20 minuts. Aquest procés es realitzà en tubs de vidre cilíndrics de 10 cm d'alçada per 10 mm de diàmetre interior. El sèrum resultant es decantà en tubs de poliestirè. Una alíquota s'utilitzà abans de tres hores per a la determinació de glucosa. Una segona, destinada a la determinació de triglicèrid es guardà a 8 °C durant 24 hores. Una tercera es congelà a -20 °C durant un període no superior a un mes, destinant-se a la determinació d'insulina.

Una alíquota de 2,5 mL de sang provinent de la primera extracció va dipositar-se en tubs que conteni en 13,5 mmol d'EDTA di-K (BDH Chemicals Ltd, Tetradome Poole, Anglaterra, referència 28024), guardant-se a 8 °C per un període no superior a les 24 hores, fins que se li practicà la determinació de l'hemoglobina glucosilada.

Les determinacions efectuades en sèrum foren les següents:

- glucosa (basal, 30, 60, 90 i 120 minuts).

- insulina (120 minuts).
- triglicèrid (basal i 120 minuts).

En els subjectes obesos també es determinà la insulina sèrica basal, ja que l'hiperinsulinisme habitual en aquestes persones feia que la informació donada per la insulina sèrica als 120 minuts, per sí sola fos inconsistent.

5. RESULTS

5.1. BIOQUÍMICA ANALÍTICA.

En aquest apartat s'exposen els resultats de les proves efectuades per a avaluar les característiques tècniques del mètode analític descrit per a la determinació de la insulina sèrica per enzimoimmunoanàlisi, així com els del control de qualitat de les determinacions dels diversos paràmetres que han entrat en estudi.

5.1.1. Estudi i avaluació de l'enzimoimmunoanàlisi d'insulina.

Les cinètiques de les reaccions descrites en 4.3.1.1., catalitzades per la peroxidasa de rave conjugada a insulina, venen expresades en la figura 5.1. en la que es representa l'absorbància en funció del temps. En el cas en què s'empraren peròxid d'hidrogen i ortofenilendiamina com a substrat i cromogen, la cinètica va ser linial durant 30 minuts, mentre que amb perborat i ABTS va ser linial durant 45 minuts. L'increment d'absorbàncies en funció del temps va resultar més gran quan la reacció catalitzada era la del peròxid d'hidrogen i ortofenilendiamina, ja que als

Figura 5.1. Cinètica de la reacció catalitzada per la peroxidasa conjugada a insulina emprant dos substrats cromogènics diferents (ABTS = Perborat i ABTS^R; OFDA = Peròxid d'hidrogen i ortofenilendiamina), seguida a 405 nm per l'ABTS i a 492 per l'OFDA.

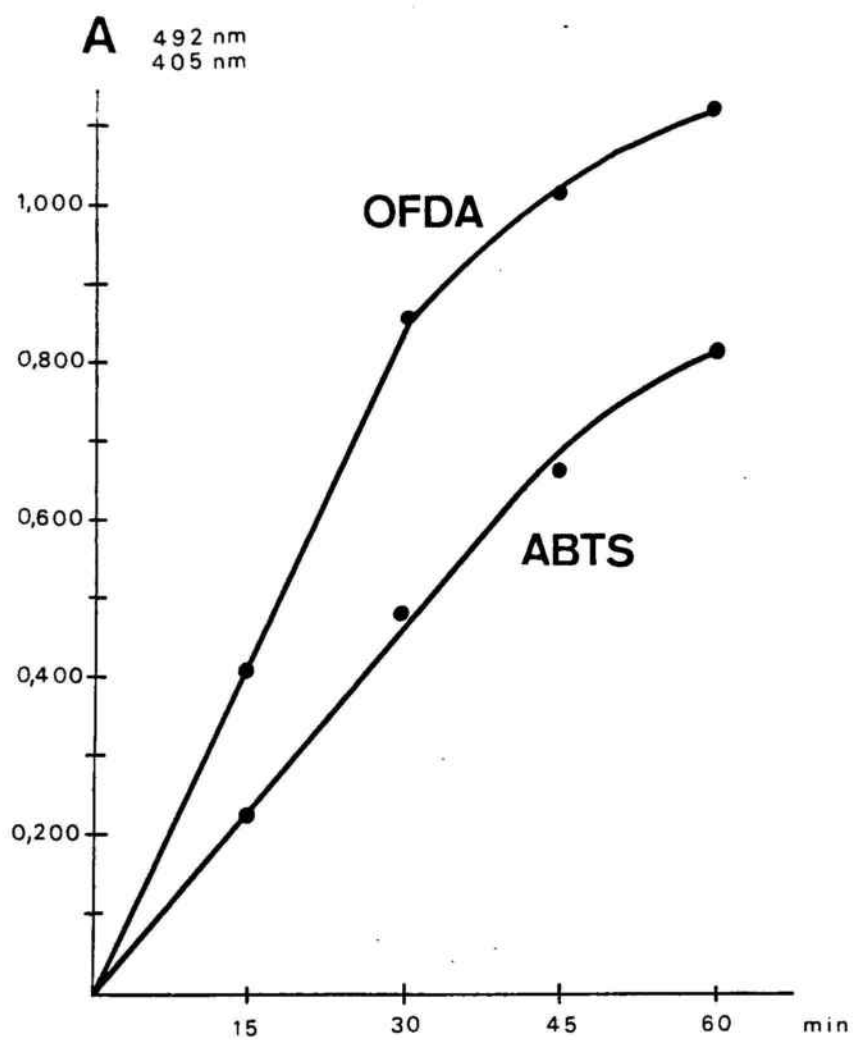


Figura 5.2. Representació gràfica en escala decimal de les absorbàncies finals en front de les concentracions d'insulina dels estàndards.

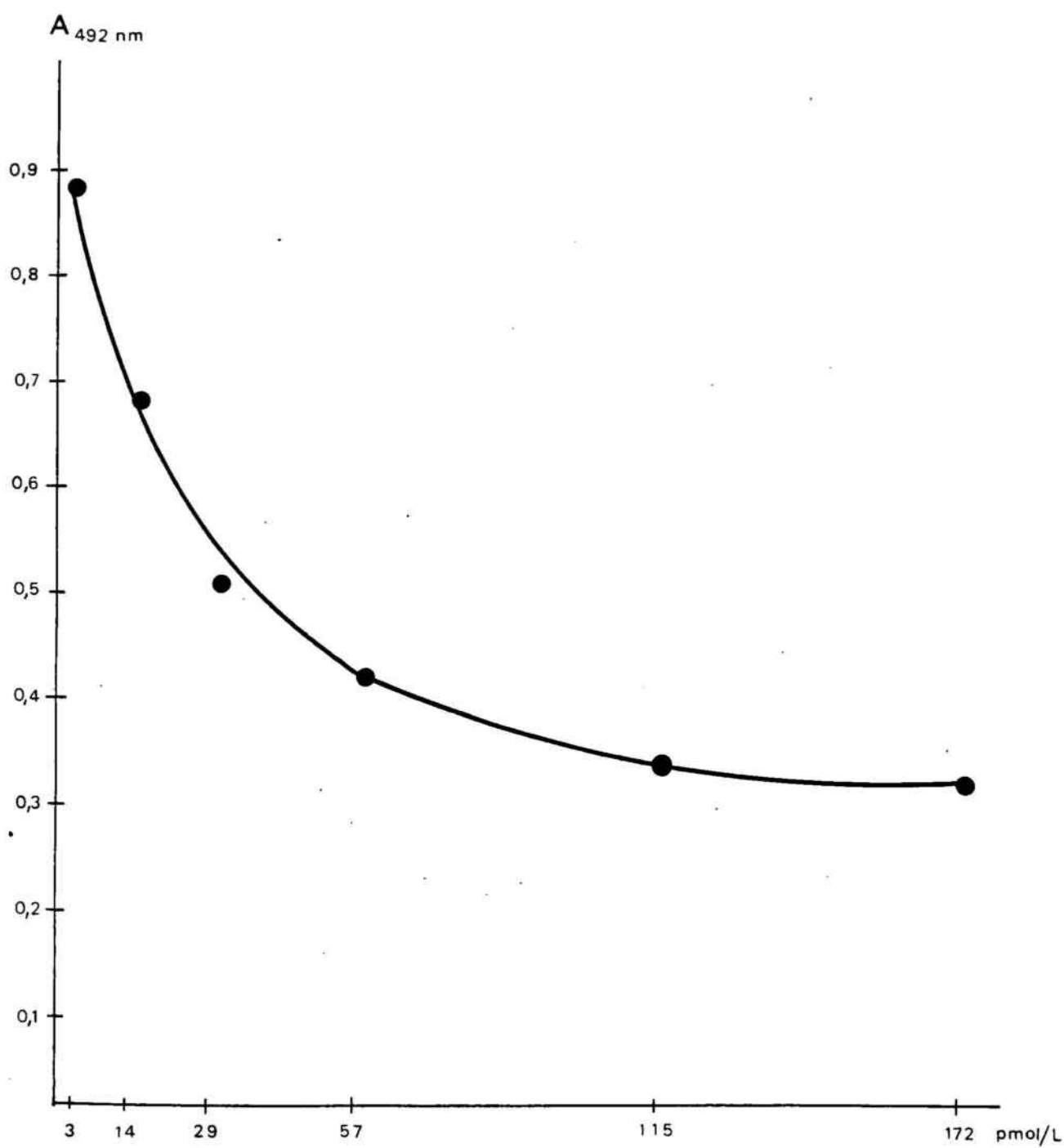
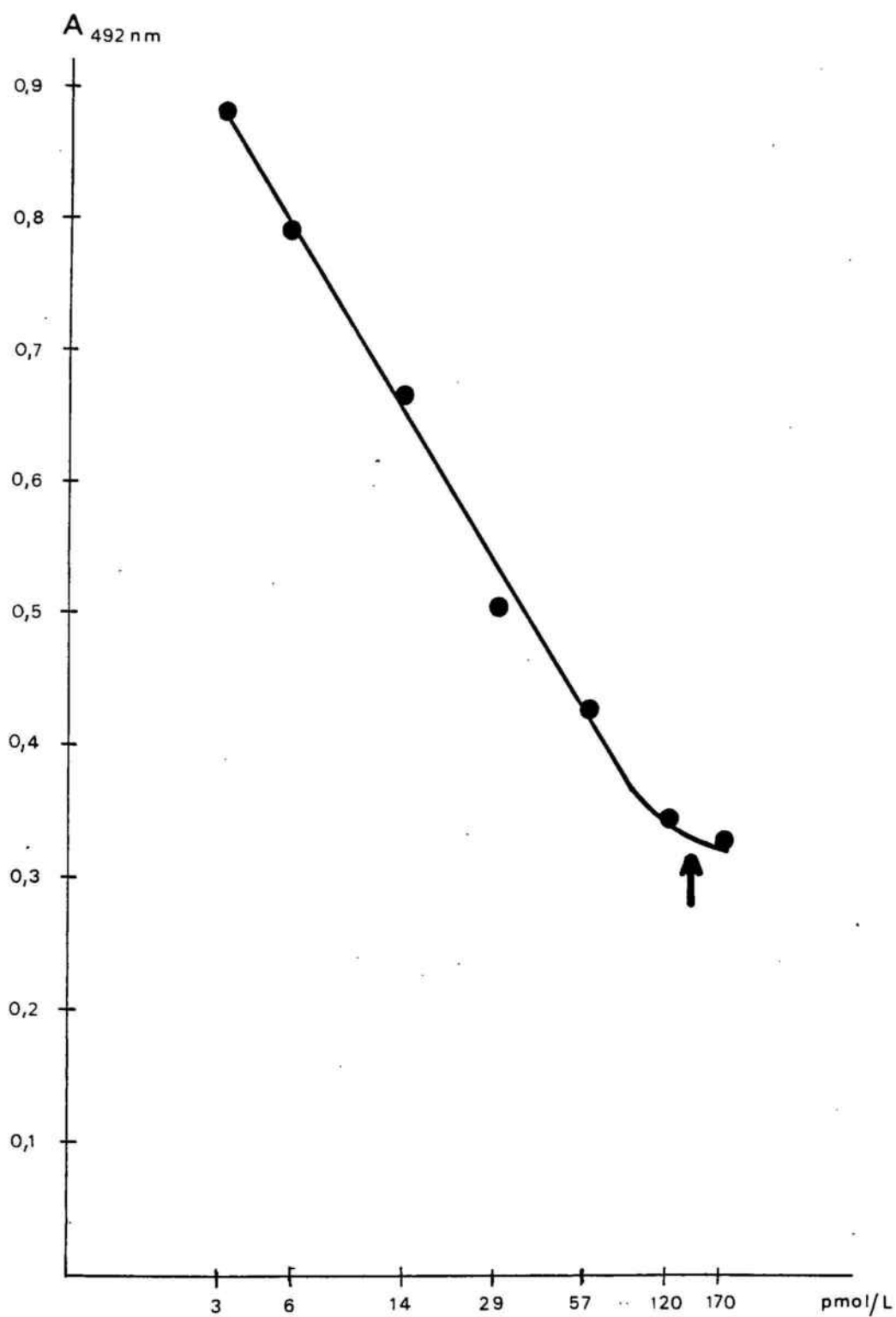


Figura 5.3. Representació gràfica de les absorbàncies finals (escala decimal) en front de les concentracions d'insulina dels estàndards (escala logarítmica). La fletxa indica el punt en què es perd la linialitat.



30 minuts s'atenyia un increment d'absorbància de 0,850 mentre que amb perborat i ABTS l'increment només era de 0,470 en el mateix període. En canvi, als 60 minuts de l'inici de la reacció la intensitat del color desenrotllat per ambdós cromogens era molt semblant.

Seguint la metodologia descrita en 4.3.1.2 s'obtingué la gràfica dosi-resposta representada en la figura 5.2 en escala decimal. La mateixa representació va fer-se en paper semilogarítmic (figura 5.3) donant com a resultat una línia recta, segons observació visual. Mitjançant un ajust per mínims quadrats (Schwartz, 1.975) a una equació de tipus logarítmic s'avaluà la dependència entre ambdues magnituds, trobant-se un coeficient de correlació de 0,982, altament significatiu.

Els 30 tubs amb blanc de reactius donaren una absorbància mitjana de 0,950, amb una desviació estàndard de 0,035. La tècnica, doncs, resultà ser sensible a la mínima quantitat d'insulina que donés lloc a absorbàncies inferiors a 0,880. Aquest valor s'obtingué restant de la mitjana la desviació estàndard multiplicada per dos. Interpolant en la gràfica absorbància-concentració d'insulina (figura 5.2), li va corres

pondre una concentració de 3 pmol/L. Com que a cada tub se li havien dispensat 1,2 mL de l'estàndard, la sensibilitat pogué fixar-se en 3,6 fmol d'insulina per tub.

En base a aquesta sensibilitat s'establí la dilució a la que s'havien de sotmetre els sèrums, mitjançant el següent càlcul:

$$\frac{3,6 \text{ fmol}/1,2 \text{ mL}}{35 \text{ pmol/L}} = \frac{1}{11,7} \times \frac{1}{12}$$

El valor de 35 pmol/L va considerar-se que era una sensibilitat suficient en funció dels objectius de la tesi, un cop examinats els valors de les concentracions d'insulina sèrica en un treball previ (Miró, 1.980). Així doncs, una part de sèrum s'havia de dissoldre en 11 parts de tampó:

La linialitat de la tècnica, establerta per observació visual de la gràfica absorbància-logaritme de la concentració (Figura 5.3), es fixà en 120 pmol/L. Tenint en compte que es decidí diluir els sèrums en la proporció 1:12, la màxima concentració d'insulina quan

tificable resultà ser de 1 440 pmol/L.

La sobrecàrrega d'estàndards amb diverses substàncies per a avaluar l'efecte interferent de les mateixes sobre la determinació enzimoinmunològica d'insulina (4.3.1.3) donà lloc a corbes sobreposades amb les dels estàndards sense sobrecarregar en els casos en què s'havia addicionat urat, àcid ascòrbic, glucosa i bilirrubina (Figures 5.4 i 5.5). En canvi, l'addició d'hemoglobina donà lloc a unes absorbàncies més altes, és a dir, a una disminució de la concentració d'insulina. La corba de les absorbàncies dels estàndards sobrecarregats amb hemoglobina resultà pràcticament paral·lela a la dels estàndards sense sobrecarregar. Això indica que la disminució d'insulina mesurada fou directament proporcional a la concentració inicial d'insulina. Per tant, com més alta era la conccentració d'insulina més important va ser el descens provocat per l'addició d'hemoglobina.

La comparació del mètode enzimoinmunològic utilitzat en aquest treball amb el radioimmunològic (4.2.5), efectuada determinant 30 mostres per ambdós mètodes, va realitzar-se mitjançant el traçat d'una recta de regressió (Figura 5.6), que va ajustar-se a l'equaa

Figura 5.4. Representació gràfica en escala decimal de les absorbàncies finals en front de les concentracions d'insulina d'una col·lecció d'estàndars sobrecarregats amb glucosa (GLU) , bilirribina (BIL) o sense cap sobrecàrrega (CS).

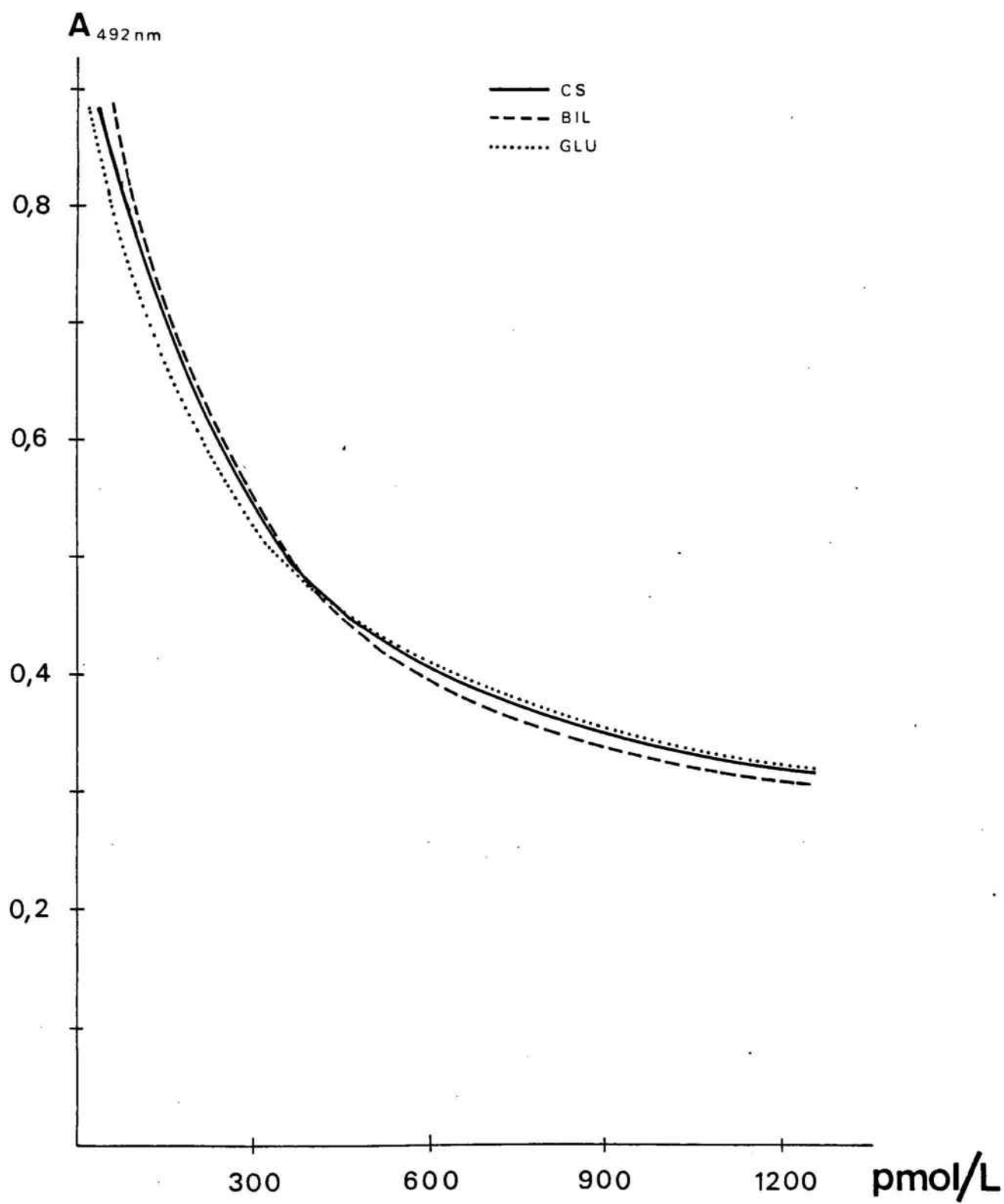


Figura 5.5. Representació gràfica en escala decimal de les absorbàncies finals en front de les concentracions d'insulina d'una col·lecció d'estàndards sobrecarregats amb hemoglobina (HEM), urat URAT), àcid ascòrbic (ASC) o sen se cap sobrecàrrega (CS).

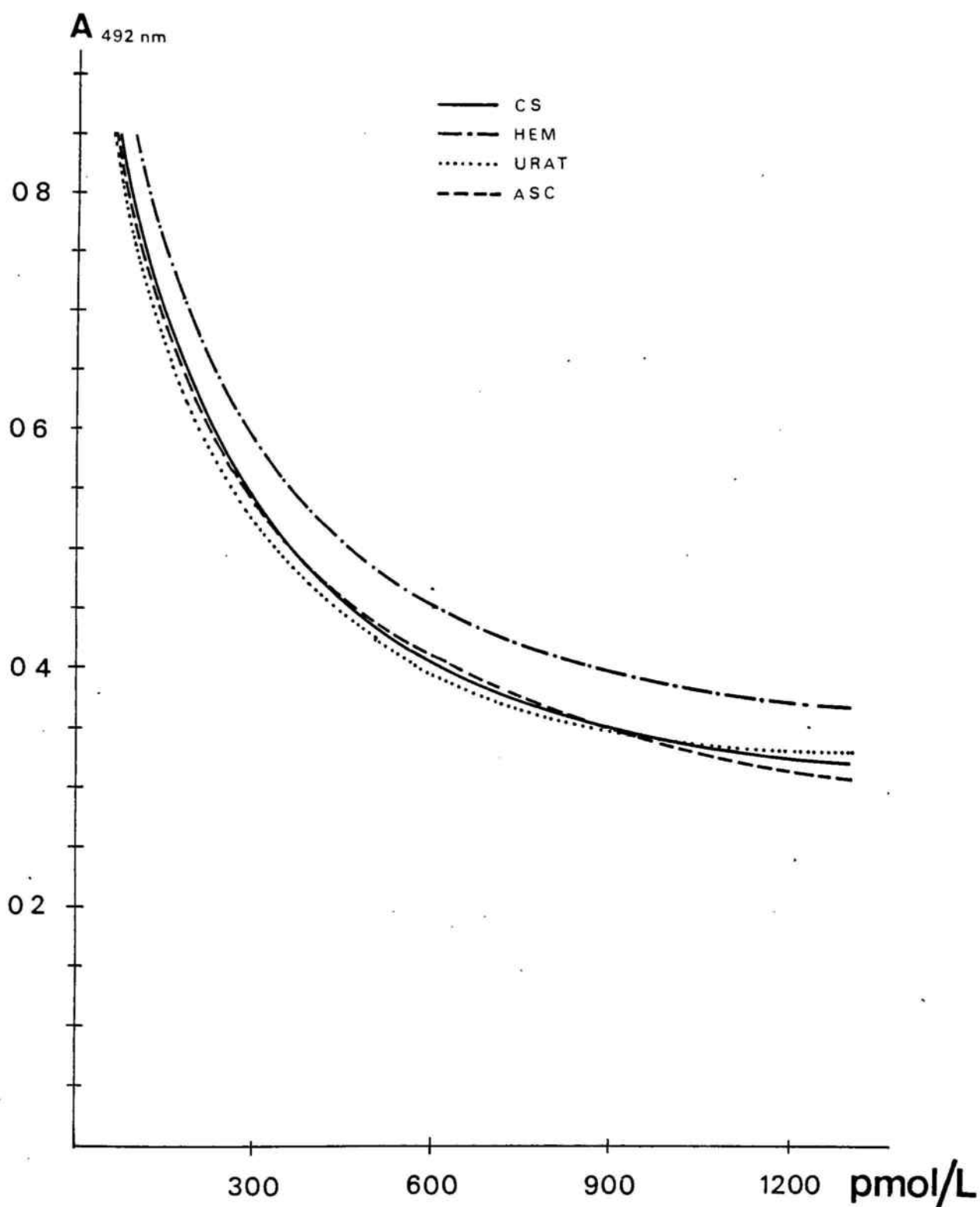
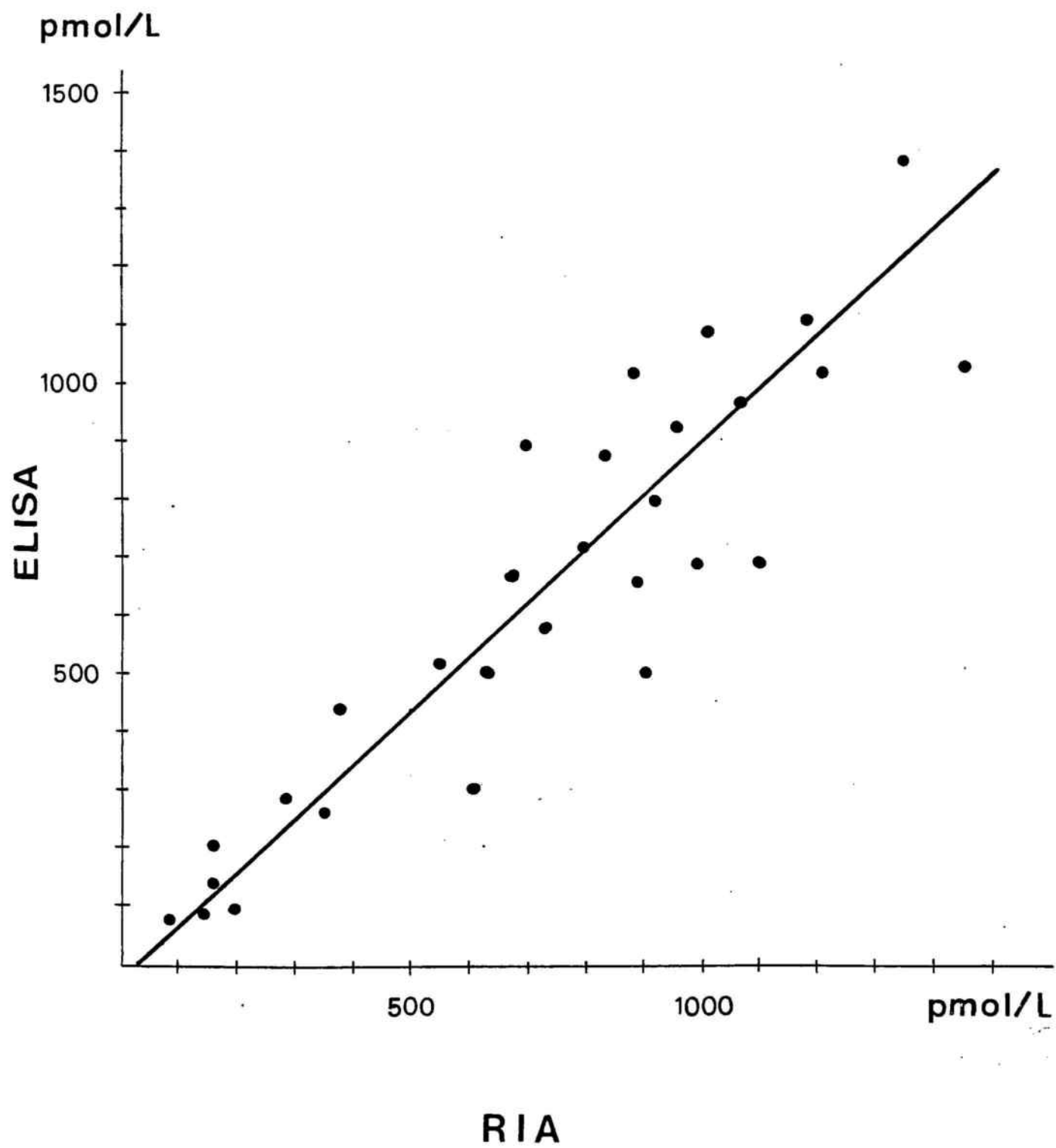


Figura 5.6. Comparació entre els resultats de concentració d'insulina sèrica obtinguts determinant trenta sèrums per enzimoimmunoanàlisi ELISA, en ordenades, i radioimmunoanàlisi RIA, en abcisses.



ció $y = (18,0 \pm 10,3) + (1,10 \pm 0,12) x$ amb un coefici-
ent de correlació de 0,952. Així doncs, el mètode en-
zimoimmunològic tingué una desviació constant de $18,0$
 $\pm 10,3$ pmol/L per damunt del mètode de referència, la
radioimmunoanàlisi. El pendent, $1,10 \pm 0,12$ no resultà
diferent de l'unitat, no apreciant-se, per tant, cap
desviació proporcional.

5.1.2. Control de qualitat.

La imprecisió del mètode enzimoimmunològic per
a la determinació de la insulina (4.2.5), evaluada
mitjançant la determinació en cada sèrie d'una alíquo-
ta del "pool" de sèrums, va resultar amb un coefici-
ent de variació del 12,3 %, a partir de 16 valors amb
una mitjana de 540 pmol/L.

La imprecisió i inexactitud de les determina-
cions de glucosa (4.2.1), avaluades mitjançant la de-
terminació de controls valorats a dos nivells, foren
les següents:

		n	$\bar{x}$	CV	ID
MONITROL I	^R	36	5,8 mmol/L	3,6%	0,97
MONITROL II	^R	36	12,6 mmol/L	2,3%	0,98

n = nombre de determinacions

$\bar{x}$ = mitjana

CV= coeficient de variació

ID= índex de desviació, calculat dividint la mitjana obtinguda pel valor mitjà atribuït pel fabricant.

Les mateixes consideracions s'aplicaren a la de terminació de triglicèrid (4.2.2), amb els següents re sultats:

	n	$\bar{x}$	CV	ID
MONITROL I ^R	32	1,32 mmol/L	5,6%	1,06
MONITROL II ^R	32	2,20 mmol/L	3,8%	1,02

La imprecisió de les determinacions de hemoglobina glucosilada (4.2.3), avaluada mitjançant la de terminació del paràmetre en una mateixa sang, dos di-
es consecutius, donà els següents valors:

n	52
X% D	0,10
S% D	0,53

en què n és el nombre de parells de determinacions, X% D

la mitjana de les diferències i $S\% D$ la desviació estàndard de les diferències.

La mitjana de $\%D$ no fou estadísticament diferent de 0,0 i la distribució de valors de $\%D$ obeeí a la llei normal (prova de Kolmogorov).

5.2. EXPERIMENTACIÓ BIOLÒGICA.

Sota el concepte d'experimentació biològica s'inclouen els resultats de les determinacions efectuades en sang procedent dels subjectes estudiats.

5.2.1. Tolerància a la glucosa.

Els valors mitjans de les concentracions de glucosa sèrica dels diferents grups, en el curs de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa, vénen representats en les figures 5.7 (subjectes no obesos) i 5.8 (subjectes obesos), posant-se de manifest la diferent severitat en el trastorn del metabolisme dels carbohidrats. La comparació de les àrees de les representacions gràfiques de la concentració de glucosa en funció del temps, calculades per planimetria i expressades en unitats arbitràries, (Quadre 5.I) confirma aquesta diferència. En efecte les mitjanes dels grups DMNID son significativament superiors a les dels grups TGA ($p < 0,05$) i aquestes a les dels subjectes normals ($p < 0,01$) tant obesos com no obesos. Si hom considera els valors individuals pot comprovar-se, però, que hi ha una intersecció considerable entre els grups TGA i DMNID

Figura 5.7. Valors mitjans de les concentracions de glucosa sèrica en el curs de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa en els grups formats per subjectes no obesos.

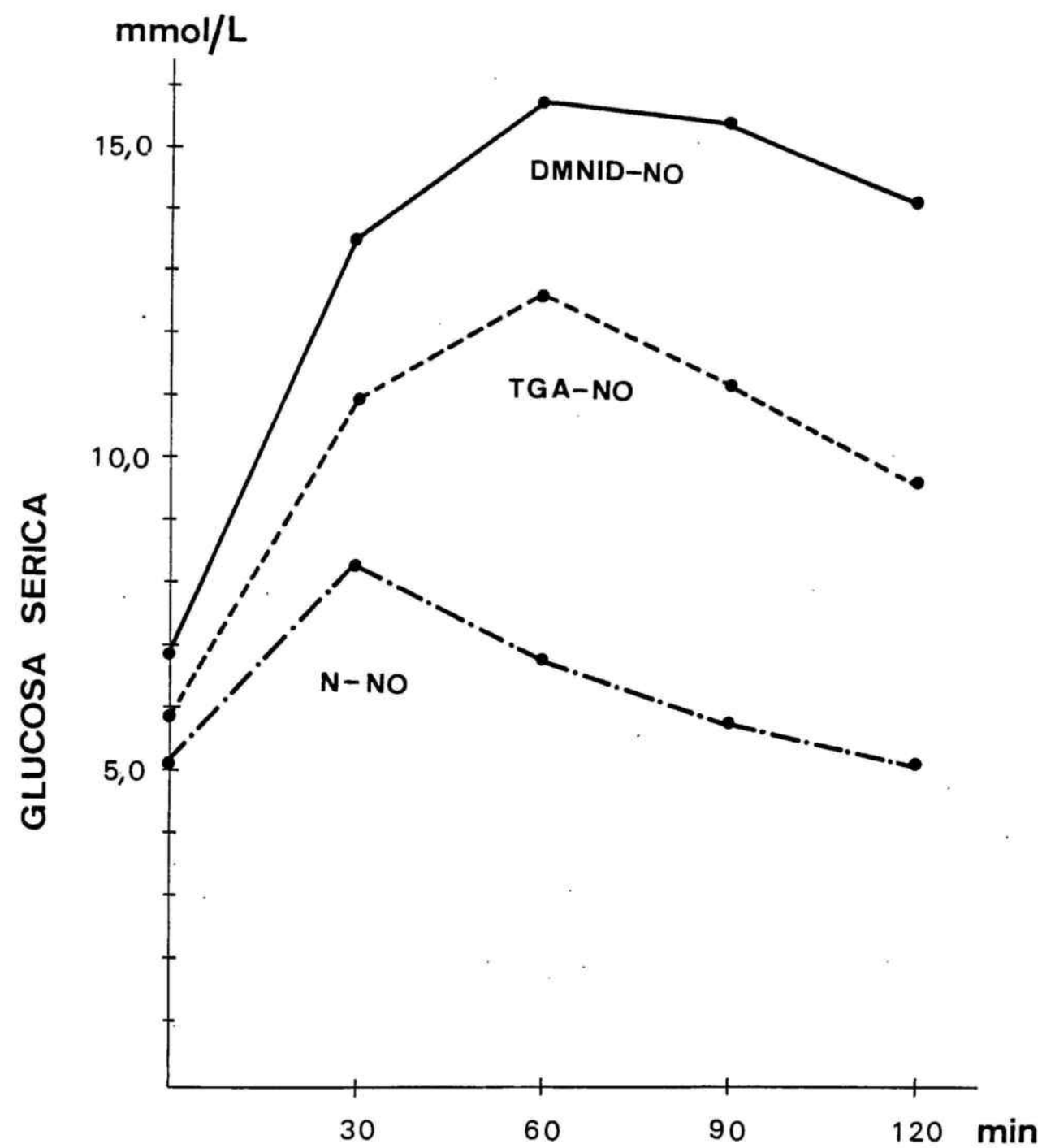
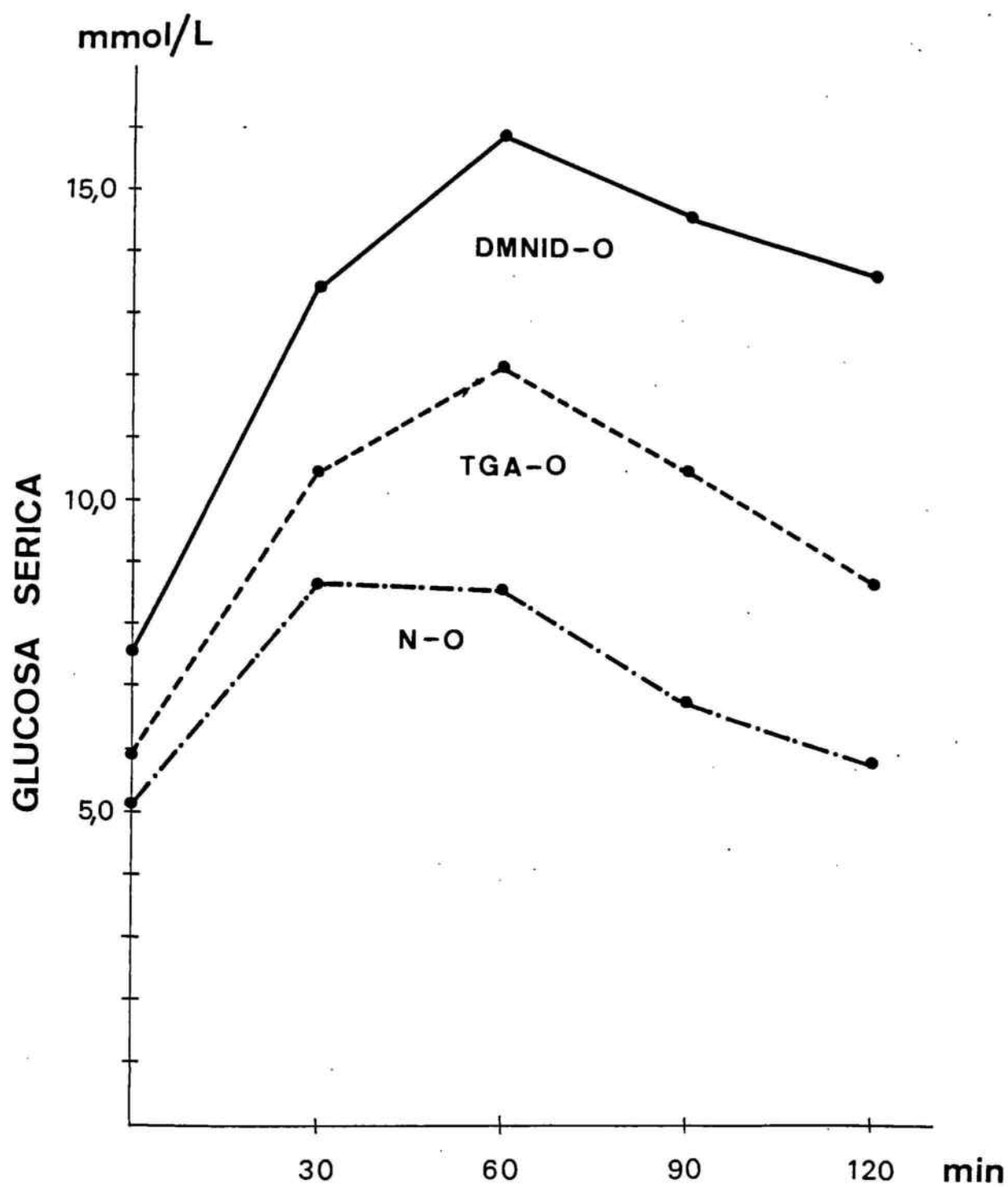


Figura 5.8. Valors mitjans de les concentracions de glucosa sèrica en el curs de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa en els grups formats per subjectes obesos.



		<u>N</u>	<u>TGA</u>	<u>DMNID</u>
Subjectes no obesos				
	$\bar{x}$	31,2	50,0	67,5
ACG				
	s	5,9	6,4	10,0
DES		p < 0,01		p < 0,05
IEDD		0,86	0,17	
Subjectes obesos				
	$\bar{x}$	34,4	47,9	59,2
ACG				
	s	4,1	6,7	14,5
DES		p < 0,01		p < 0,05
IEDD		0,78	0,33	

QUADRE 5.I. Valors de les àrees de les corbes de glucèmia als diferents grups estudiats. ACG= Area corba glucèmia en unitats arbitràries $\bar{x}$ = mitjana (un. arb); s= desviació estàndard (un. arb); DES= diferències estadístiques significatives, grau de significació; IEDD= índex d'eficàcia diagnòstica diferencial.

tant pels obesos (Figura 5.9) com pels no obesos (Figura 5.10), amb uns índexs d'eficàcia diagnòstica diferencial de 0,17 i 0,33, respectivament. La intersecció entre els grups TGA i Normals va ser menys important, amb uns índexs d'eficàcia diagnòstica diferencial de 0,86 pels no obesos i 0,78 pels obesos.

Les concentracions de glucosa sèrica als 120 minuts palesen un comportament semblant, presentant-se unes mitjanes significativament superiors en els grups DMNID respecte els TGA ($p < 0,05$) i en aquests respecte els normals ($p < 0,01$) (Quadre 5.II), tant en els obesos com en els no obesos. També en aquest cas existeix intersecció (Figura 5.11, no obesos; Figura 5.12, obesos), no solament entre DMNID i TGA, amb uns índexs d'eficàcia diagnòstica diferencial de 0,28 pels obesos i 0,33 pels no obesos, sinó també entre TGA i Normal amb uns índexs d'eficàcia diagnòstica diferencial de 0,83 pels no obesos i 0,71 pels obesos.

5.2.2. Resposta insulínica a la sobrecàrrega oral de glucosa.

En els subjectes no obesos la resposta insulí-

Figura 5.9. Valors de les àrees de la gràfica gluco
sa sèrica vs temps (corba de glucèmia) en
el curs de la prova de sobrecàrrega oral
de glucosa per als subjectes no obesos dels
diferents grups expressades en unitats ar-
bitràries (un. arb.).

AREES DE LES CORBES DE GLUCEMIA

UN. ARB.

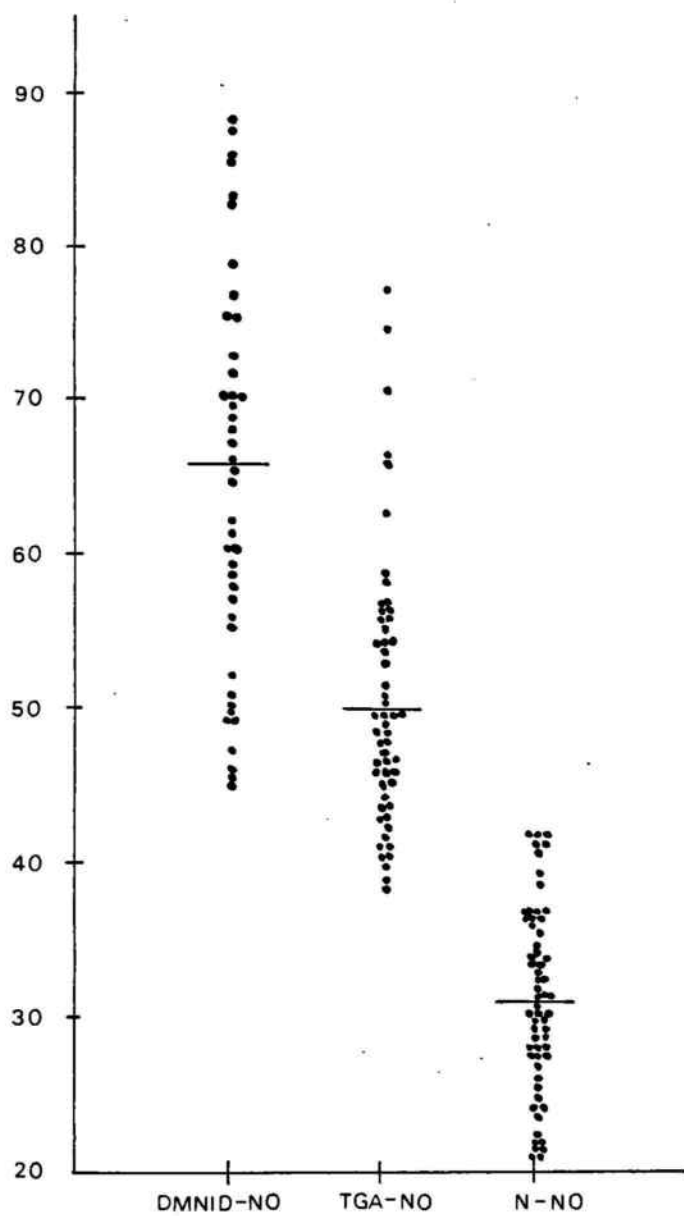
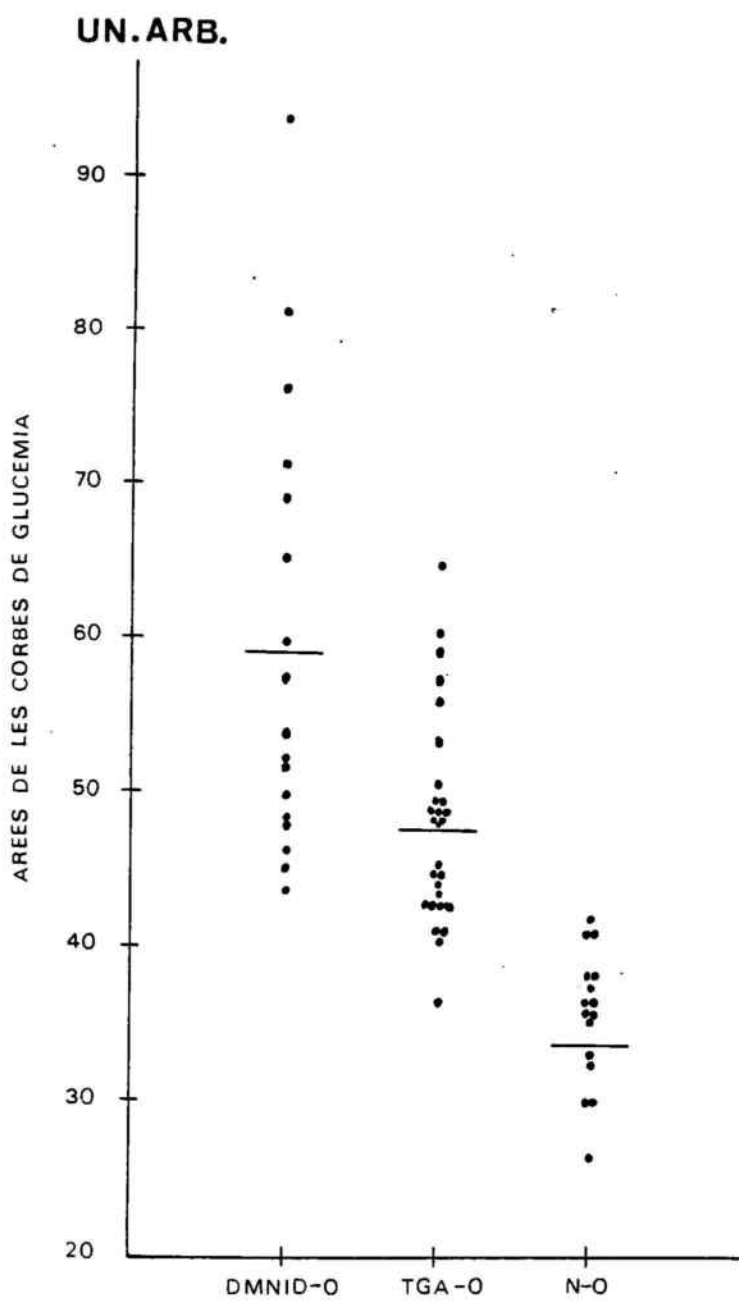


Figura 5. 10. Valors de les àrees de la gràfica glucosa sèrica vs temps (corba de glucèmia) en el curs de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa per als subjectes obesos dels diferents grups estudiats, expressades en unitats arbitràries (un. arb.).



		<u>N</u>	<u>TGA</u>	<u>DMNID</u>
Subjectes no obesos				
Glucosa sèrica (mmol/L)	$\bar{x}$	5,2	9,6	14,2
	s	1,1	2,3	3,9
DES		p < 0,01	p < 0,01	
IEDD		0,83	0,28	
Subjectes obesos				
Glucosa sèrica min (mmol/L)	$\bar{x}$	6,2	9,8	13,0
	s	0,8	1,7	4,4
DES		p < 0,05	p < 0,05	
IEDD		0,71	0,33	

QUADRE 5.II. Valors de les concentracions de glucosa sèrica als 120 minuts. $\bar{x}$ = mitjana; s= desviació estàndard; DES= diferències estadístiques significatives, grau de significació; IEDD= índex d'eficàcia diagnòstica diferencial.

Figura 5. 11. Valors de la concentració de glucosa sèrica als 120 minuts de la ingestió de glucosa en els subjectes no obesos dels diferents grups.

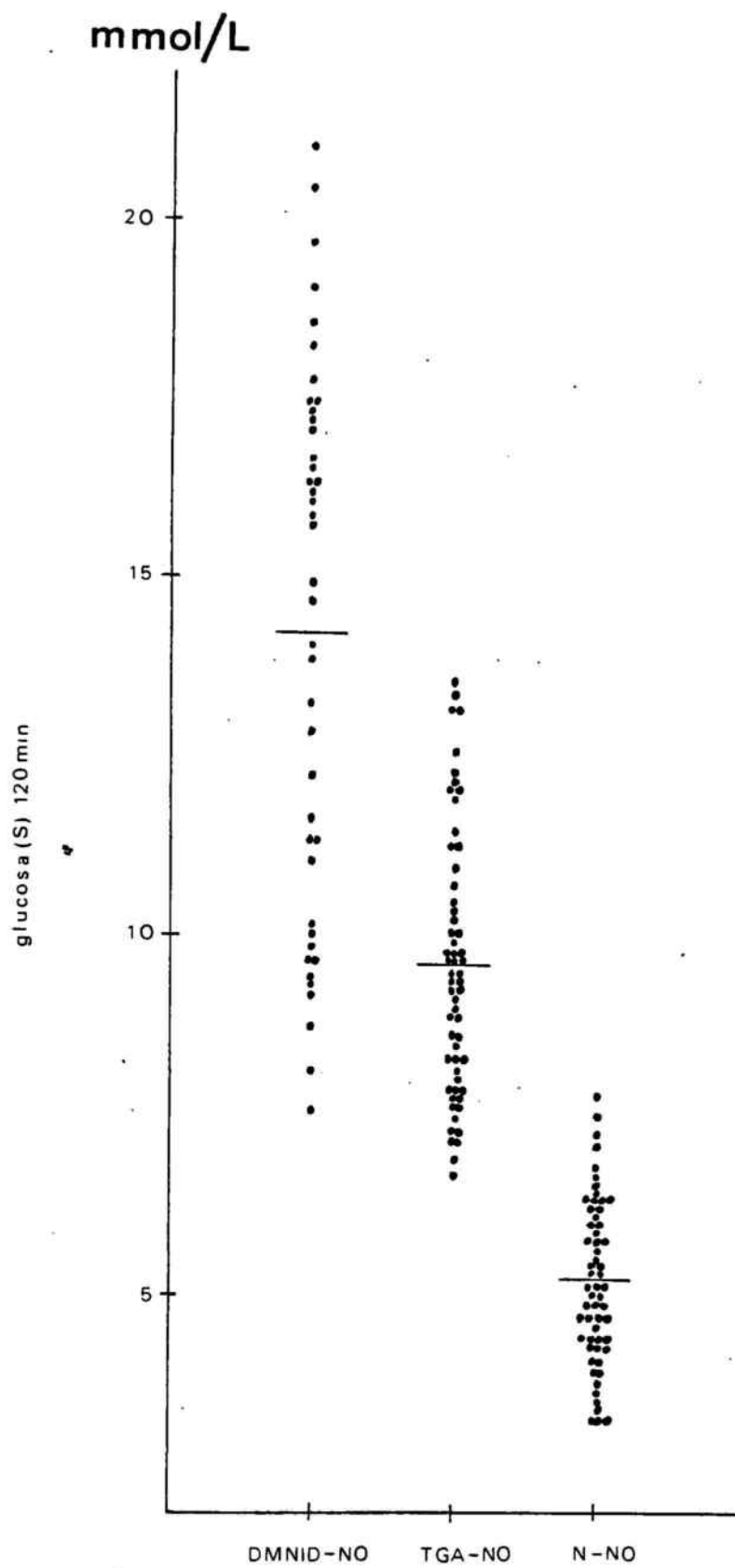
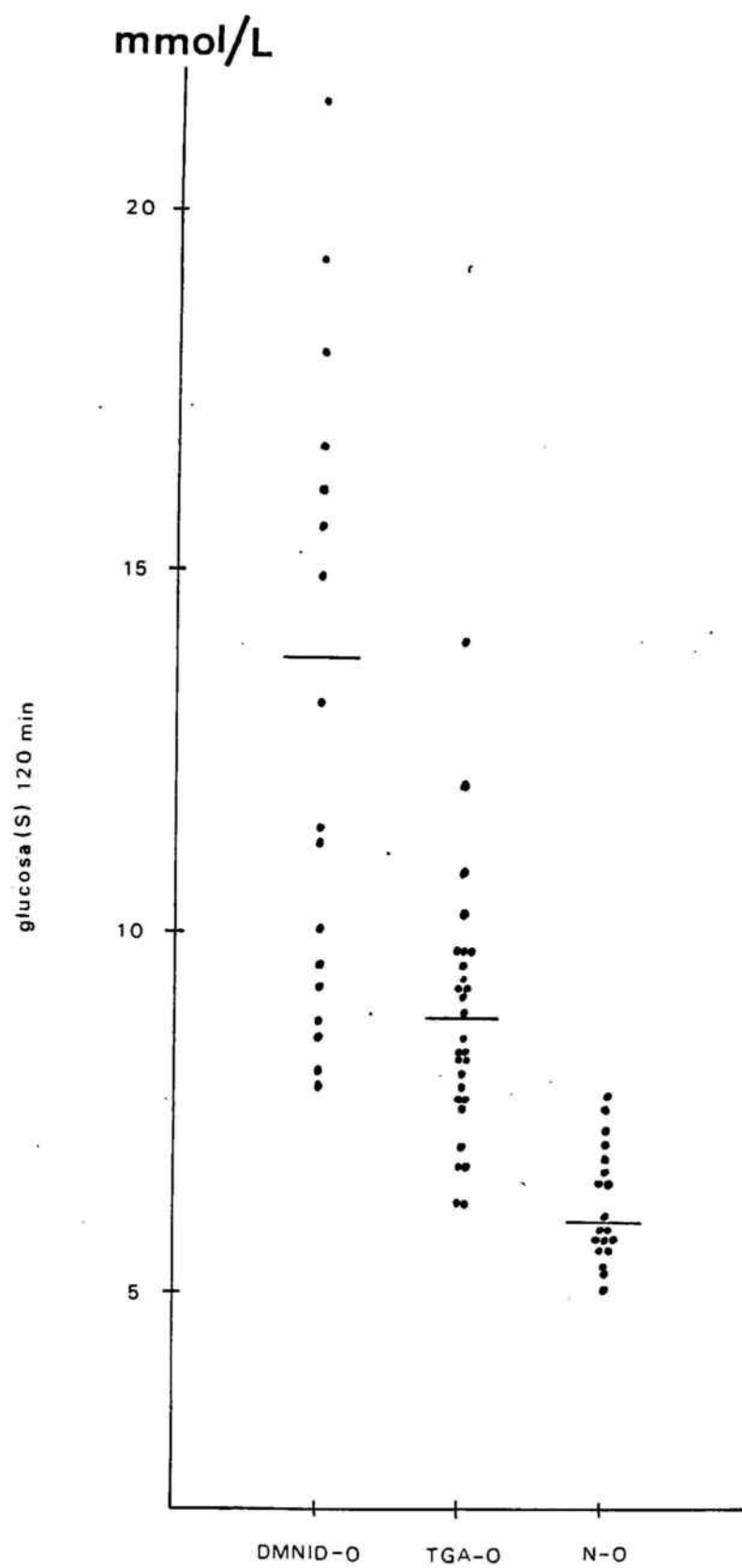


Figura 5. 12. Valors de la concentració de glucosa sèrica als 120 minuts de la ingestió de glucosa en els subjectes obesos dels diferents grups.



nica als 120 minuts fou molt més elevada en els classificats com a TGA, que en els DMNID i normals (Quadre 5.III). Les diferències entre els grups TGA i els altres dos foren estadísticament significatives i la intersecció relativament poc important. Així, l'índex d'eficàcia diagnòstica diferencial entre els grups TGA i Normals fou de 0,95 i entre els grups TGA i DNID fou de 0,90 (Figura 5.13).

En els subjectes obesos la insulina(S) als 120 minuts tingué una variabilitat molt gran i no es pogueren apreciar diferències significatives entre cap grup (Quadre 5.III). En canvi, el quocient entre la insulina(S) als 120 minuts i la insulina(S) basal fou significativament més alt en el grup TGA (Quadre 5. IVb). L'índex d'eficàcia diagnòstica diferencial entre els grups TGA i Normal fou de 0,80 i entre TGA i DMNID 0,86 (Figura 5.14).

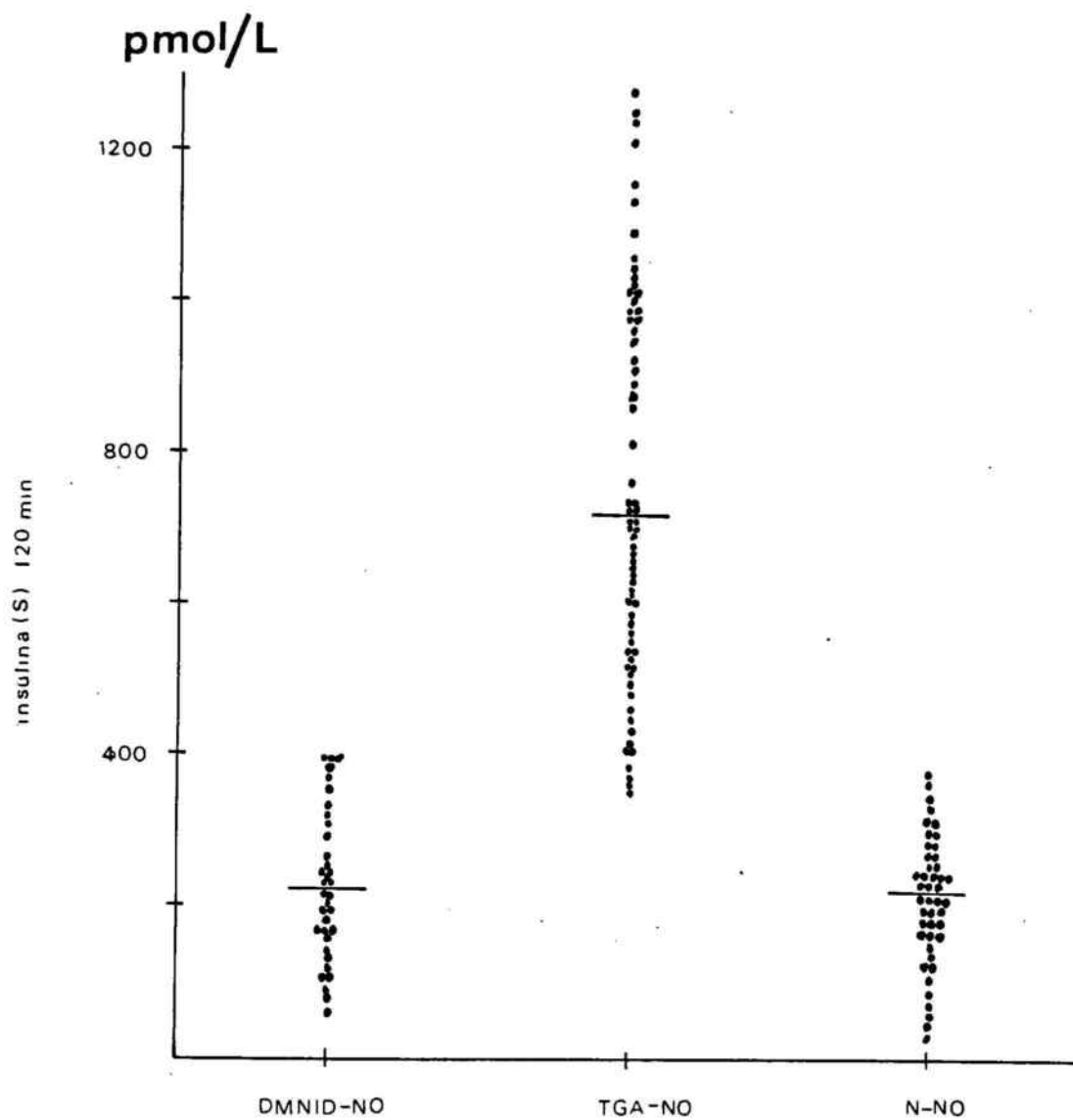
5.2.3. Avaluació conjunta de les concentracions sèriques de glucosa i insulina.

En els subjectes no obesos la representació en un eix de coordenades dels punts originats pels valors

		<u>N</u>	<u>TGA</u>	<u>DMNID</u>
Subjectes no obesos				
Insulina sèrica 120 min (pmol/L)	$\bar{x}$	221	718	219
	s	75	270	92
DES		p < 0,01	p < 0,01	
IEDD		0,95	0,90	
Subjectes obesos				
Insulina sèrica 120 min (pmol/L)	$\bar{x}$	689	738	850
	s	271	188	320
DENS		$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,05$	

QUADRE 5. III. Valors de les concentracions d'insulina sèrica als 120 minuts. $\bar{x}$ = mitjana; s = desviació estàndard; DES = diferències estadísticament significatives, grau de significació; DENS = diferències estadísticament no significatives, nivell de significació; IEDD = índex d'eficàcia diagnòstica diferencial.

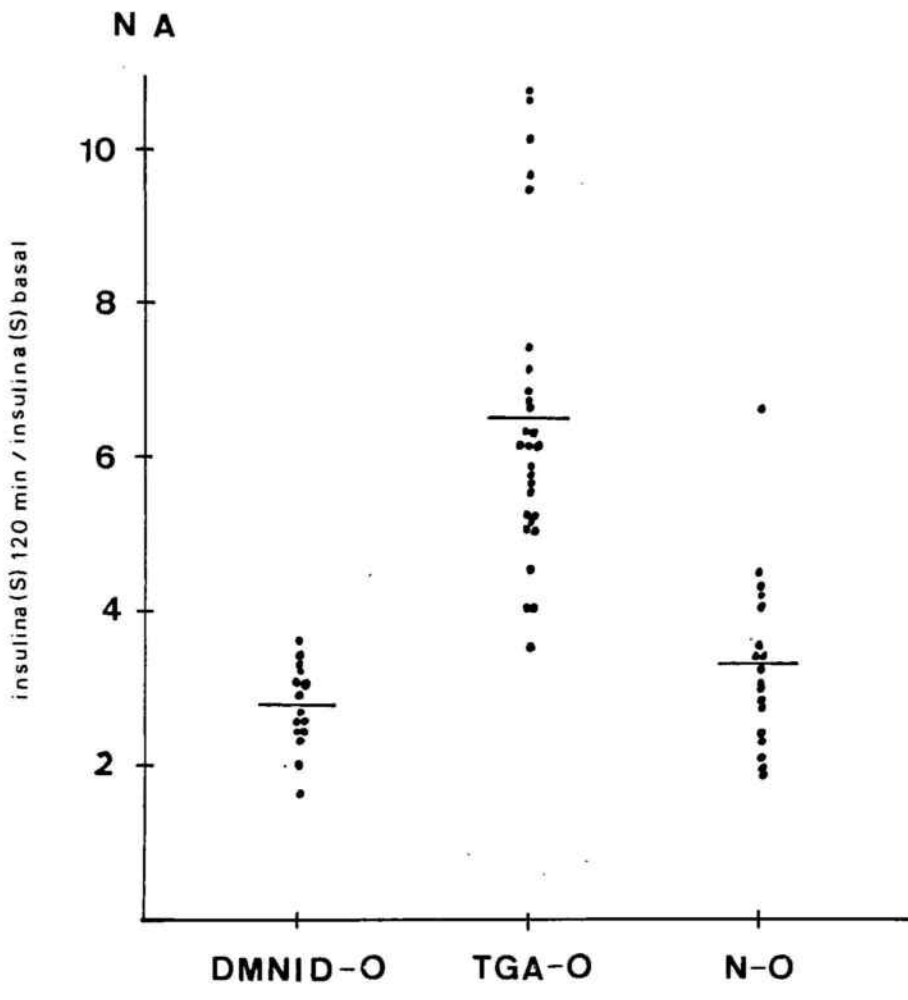
Figura 5. 13. Valors de la concentració d'insulina sèrica als 120 minuts de la ingestió de glucosa en els subjectes no obesos dels diferents grups.



	<u>N</u>	<u>TGA</u>	<u>DMNID</u>
a) Subjectes no obesos			
$\bar{x}$		15	74
G_{120}/I_{120}			
s		6	30
DES		p < 0,01	
IEDD		1,00	
b) Subjectes obesos			
$\bar{x}$	3,3	6,5	2,8
I_{120}/I_b			
s	2,0	2,0	0,5
DES	p < 0,01		p < 0,01
IEDD	0,80	0,96	

QUADRE 5.IV. Quocients amb interès diagnòstic. G_{120} = concentració de glucosa sèrica als 120 minuts, en $\mu\text{mol/L}$; I_{120} = concentració d'insulina sèrica als 120 minuts, en pmol/L ; I_b = concentració d'insulina sèrica basal, en pmol/L ; $\bar{x}$ = mitjana; s= desviació estàndard; DES= diferències estadístiques significatives, grau de significació; IEDD= índex d'eficàcia diagnòstica diferencial.

Figura 5. 14. Valors dels quocients entre la insulina sèrica als 120 minuts de la ingestió de glucosa i la insulina sèrica basal, expressada en números adimensionals (N A), en els subjectes obesos dels diferents grups.



de les concentracions de glucosa i insulina sèriques als 120 minuts es distribuï en dues zones clarament diferenciades, la dels individus normals i la dels que patien intolerància a la glucosa, és a dir, pertanyien en als grups TGA i DNID (Figura 5.15). El que els va diferenciar fou la distància a l'origen de coordenades que en els subjectes normals resultà ser més baixa. Com que la distància des de qualsevol punt a l'origen de coordenades és igual a l'arrel quadrada de la suma de les distàncies des de l'origen de coordenades a llur projecció sobre els eixos elevades al quadrat, pogué comprovar-se que sumant els valors de la glucosa i la insulina sèriques als 120 minuts, elevats ambdós al quadrat, s'obté un paràmetre que en el grup format per subjectes normals va tenir valors més baixos que en els altres dos (Quadre 5. Va). La intersecció fou molt reduïda, amb un índex d'eficàcia diagnòstica diferencial de 1,00 entre normals i TGA i 0,96 entre normals i DNID.

Per a poder aplicar els mateixos criteris a individus obesos s'hagué de substituir en la suma anterior el valor de la insulina (S) als 120 minuts pel quocient entre la insulina (S) als 120 minuts i la insulina (S) basal (Figura 5.16). La suma de la glucosa (S)

	<u>TGA</u>	<u>N</u>	<u>DMNID</u>
a) Subjectes no obesos			
$G_{120}^2 + I_{120}^2 \cdot 10^{-4} \bar{x}$	159	33	130
s	76	14	52
DES	$p < 0,01$	$p < 0,01$	
IEDD	1,00	0,97	

b) subjectes obesos			
$\bar{x}$	126	45	159
$G_{120}^2 + (I_{120}/I_b)^2$			
s	44	9	90
DES	$p < 0,01$	$p < 0,01$	
IEED	0,92	0,95	

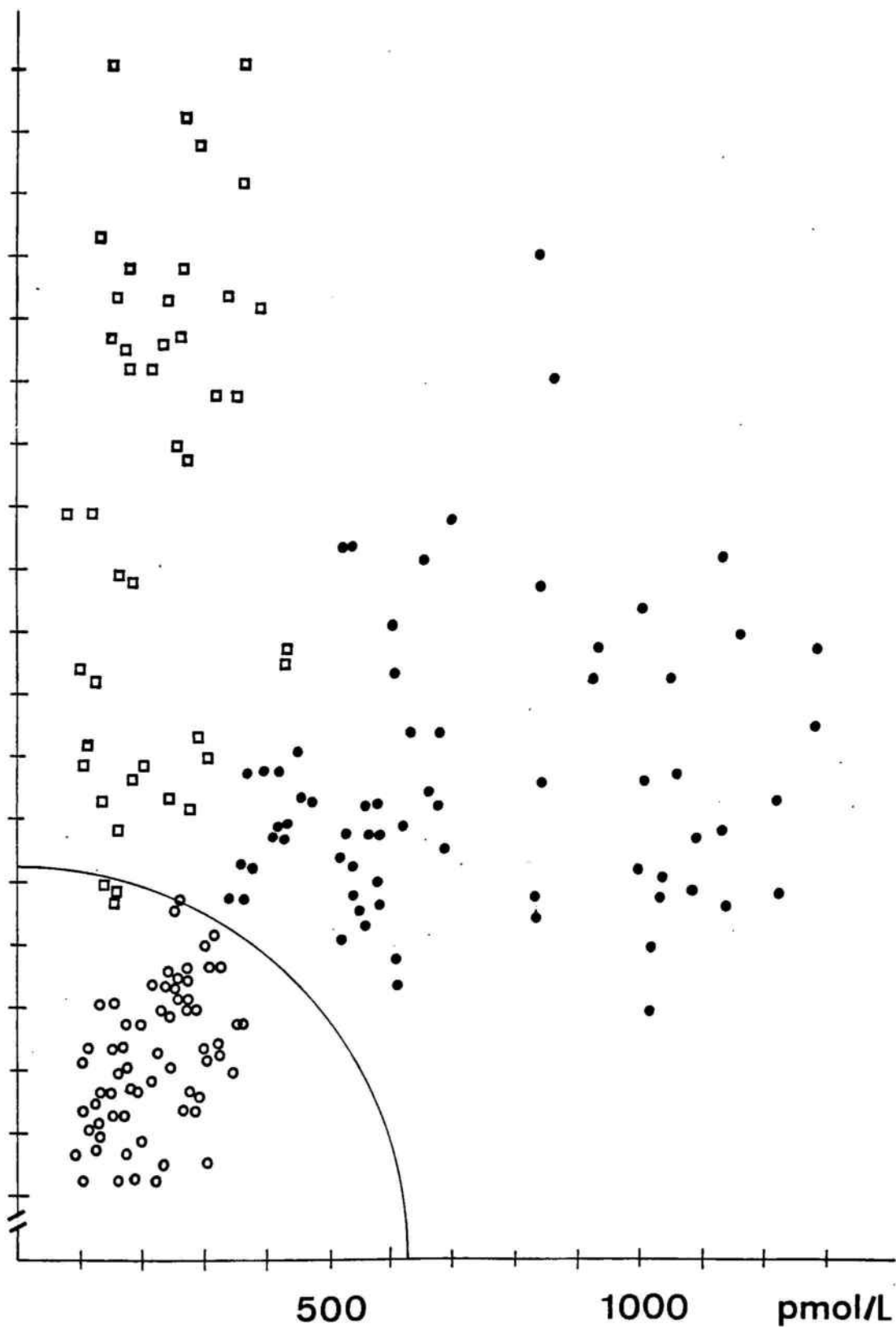
QUADRE 5.V. Diferents combinacions de paràmetres amb interès diagnòstic. G_{120} = concentració de glucosa sèrica als 120 minuts, en mmol/L; I_{120} = concentració d'insulina sèrica als 120 minuts, en pmol/L; I_b = concentració d'insulina sèrica, en pmol/L; $\bar{x}$ mitjana; s = desviació estàndard; DES = diferències estadístiques significatives, grau de significació; IEED = índex d'eficàcia diagnòstica diferencial.

Figura 5. 15. Representació en un eix de coordenades dels punts originats pels valors de les concentracions sèriques de glucosa (ordenades) i insulina (abscisses) als 120 minuts de la ingestió de glucosa, en els subjectes no obesos dels diferents grups (o = normals, ● = TGA, □ = DMNID).

mmol/L

20,0

10,0



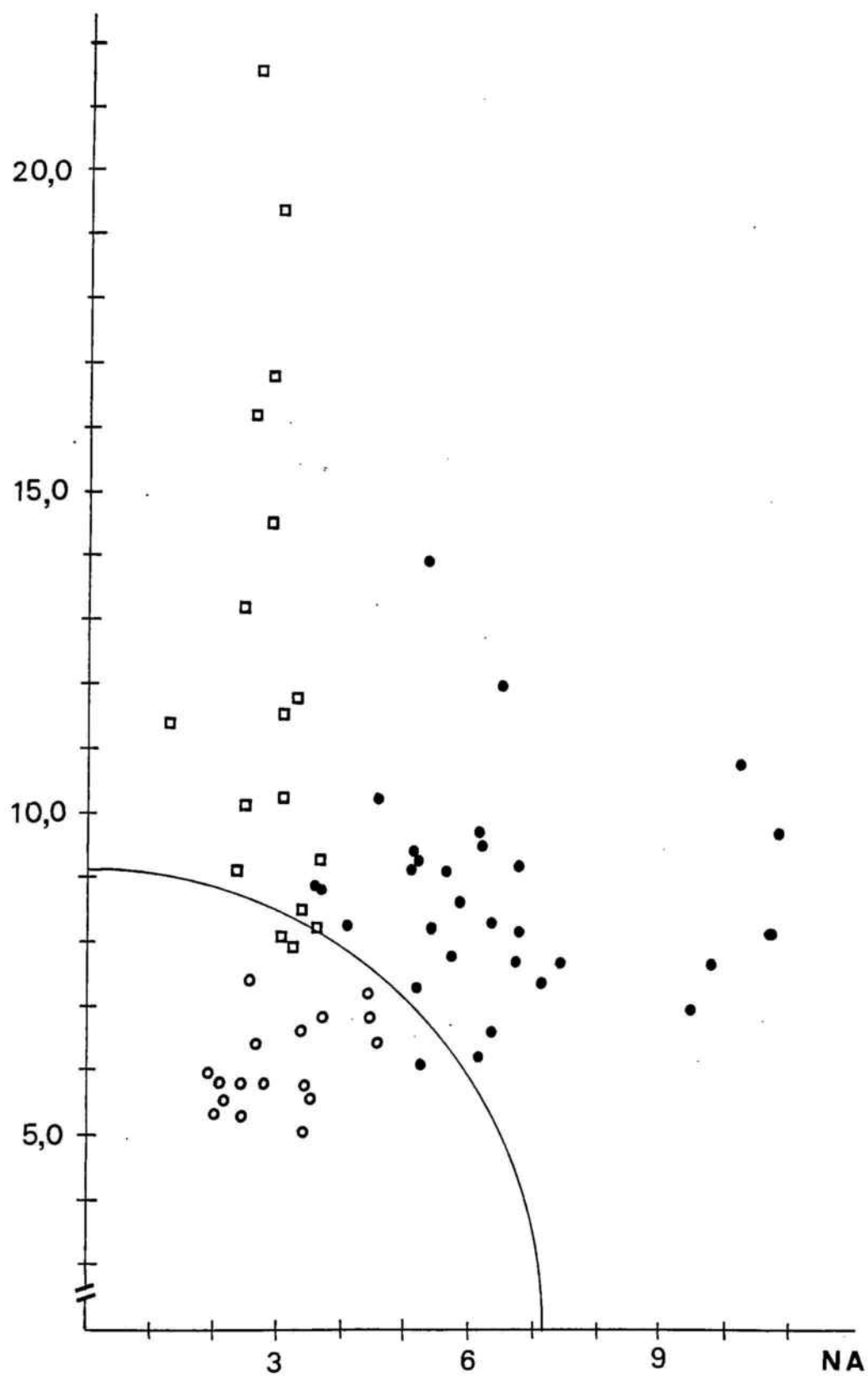
500

1000

pmol/L

Figura 5. 16. Representació en un eix de coordenades dels punts originats pels valors de la concentració de glucosa sèrica als 120 minuts de la ingestió de glucosa (ordenades) i el quocient entre les concentracions d'insulina sèrica als 120 minuts i en condicions basals, en els subjectes obesos dels diferents grups (o = normals, ● = TGA, □ = DMNID). (NA = número adimensional).

mmol/L



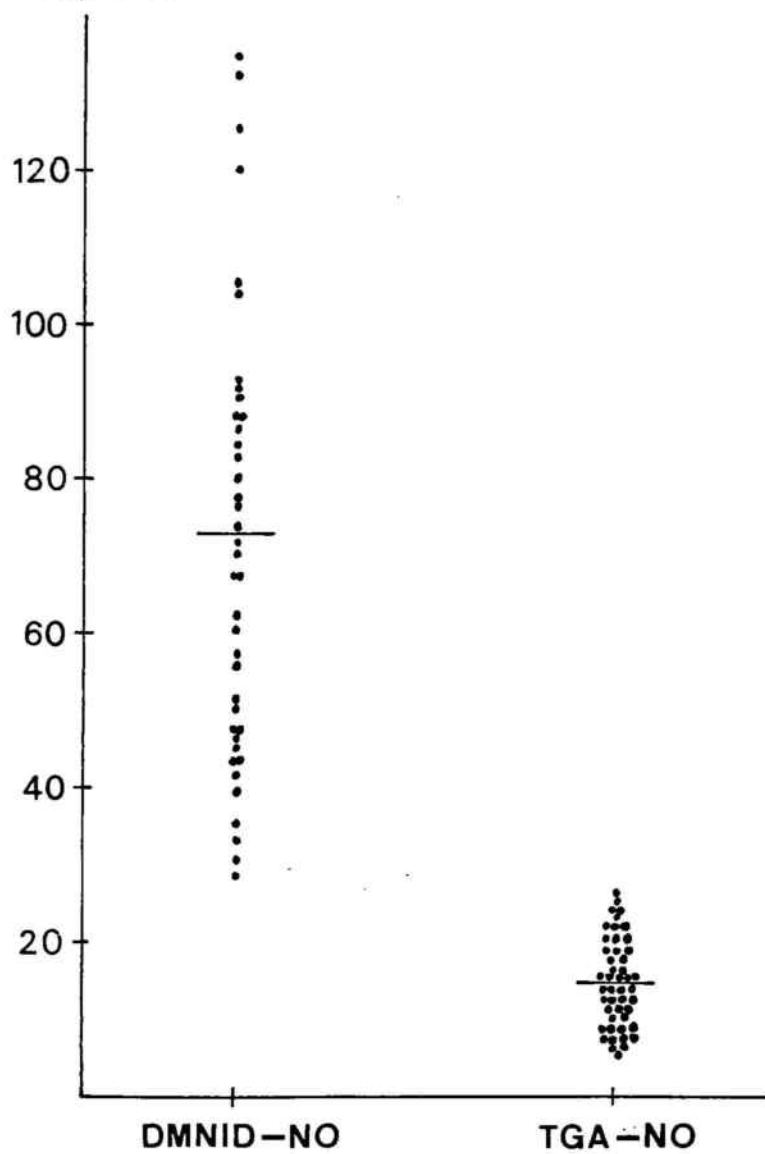
120 minuts, elevada al quadrat, i el quocient insulina (S) 120 min/insulina (S) basal, elevat també al quadrat, foren significativament més baixes en els subjectes normals que en els dels grups TGA i DMNID (Quadre 5 Vb). La intersecció fou relativament baixa, amb uns índexs d'eficàcia diagnòstica diferencial de 0,92 entre els grups Normal i TGA i de 0,95 entre els grups Normal i DMNID.

En els subjectes no obesos el quocient entre glucosa (S) i insulina (S) als 120 minuts fou significativament superior en el grup DMNID respecte a TGA (Quadre 5.IVa). La intersecció fou pràcticament nul·la (figura 5.17), amb uns índexs d'eficàcia diagnòstica diferencial de 1,00. En les persones obesos aquest quocient no va aportar cap informació útil.

Per a articular aquests resultats varen dissenyar-se segles algorismes, un per a subjectes obesos i l'altre per a no obesos, que va permetre de veure a quin dels tres grups pertanyia cada subjecte, en funció dels valors de les concentracions de glucosa i insulina sèriques als 120 minuts, afegint-hi el de la insulina basal en el cas de persones obesos.

Figura 5. 17.. Quocients entre la concentració de glucosa sèrica, en $\mu\text{mo/L}$, i insulina sèrica, en pmol/L , dels subjectes no obesos dels grups TGA i DMNID.

G_{120}/I_{120}



En el cas dels subjectes no obesos (Figura 5.18), si la suma de la glucosa (S) als 120 minuts, expressada en mmol/L i la insulina (S) als 120 minuts, expressada en pmol/L, dividida per 100 i elevades al quadrat, fos inferior a 60 es tractaria d'un individu normal. Si fos superior a 60 podria pertànyer tant al grup TGA com al grup DMNID. Si el quocient entre la glucosa (S) als 120 minuts, expressada en umol/L i la insulina (S) als 120 minuts, expressada en pmol/L, fos inferior a 28 es tractaria d'un subjecte pertanyent al grup TGA, mentre que si fos superior a aquest valor formaria part del grup DMNID.

Per als subjectes obesos (Figura 5.19) si la suma de glucosa (S) als 120 minuts, expressada en mmol/L i el quocient entre insulina (S) als 120 minuts i la insulina (S) basal, ambdues quantitats elevades al quadrat, fos inferior a 70 es tractaria d'un individu normal. Si fos superior a aquest valor podria pertànyer tant al grup TGA com DMNID. Llavors, si el quocient $\frac{\text{insulina (S) 120 minuts}}{\text{insulina (S) basal}}$ fos superior a 3,6 es tractaria d'un individu pertanyent al grup TGA, mentre que si fos inferior a aquest valor formaria part del grup DMNID.

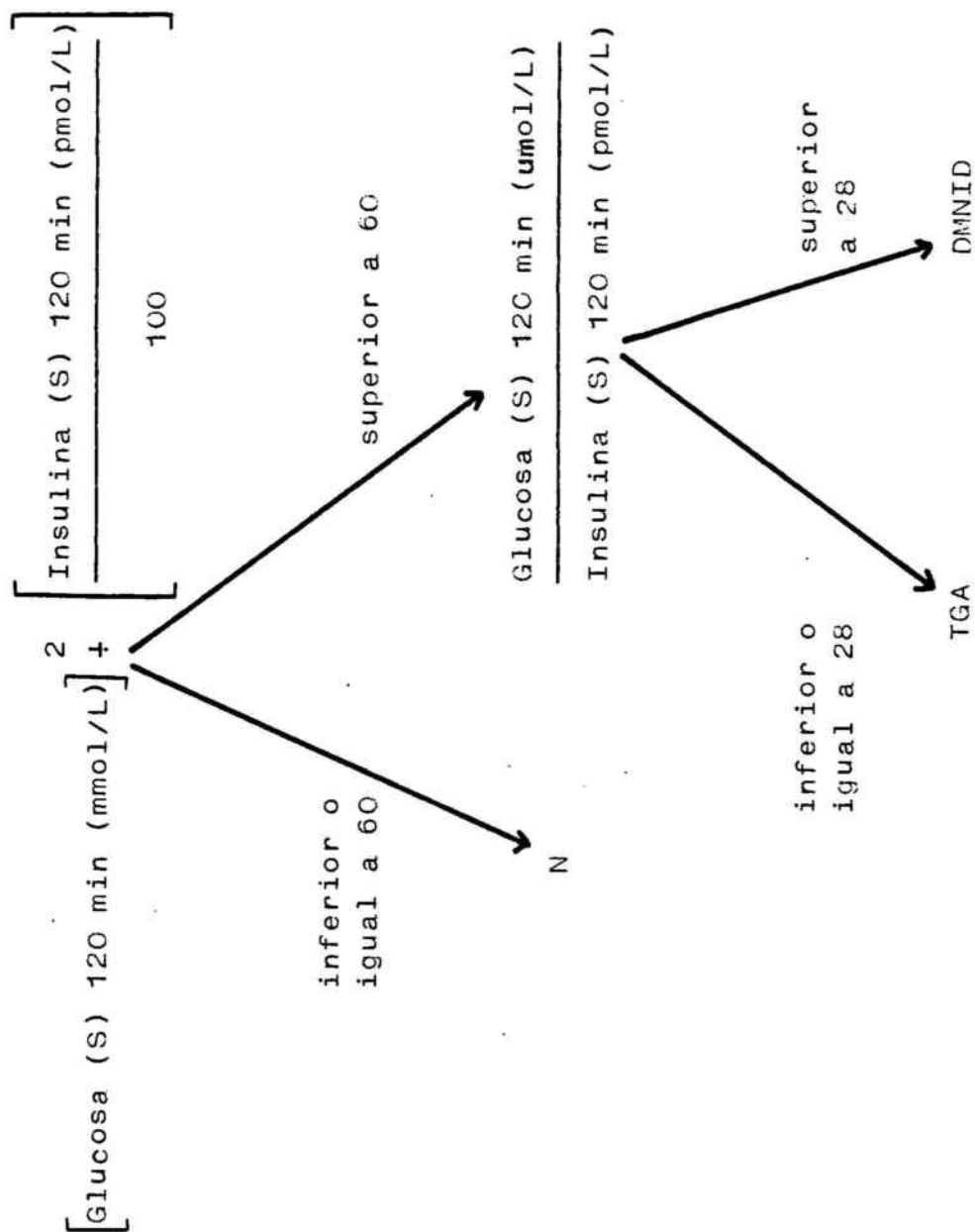


Figura 5.18. Algorisme que permet determinar a quin grup pertany un individu no obès coneixent els valors de les concentracions sèriques de glucosa i insulina als 120 minuts.

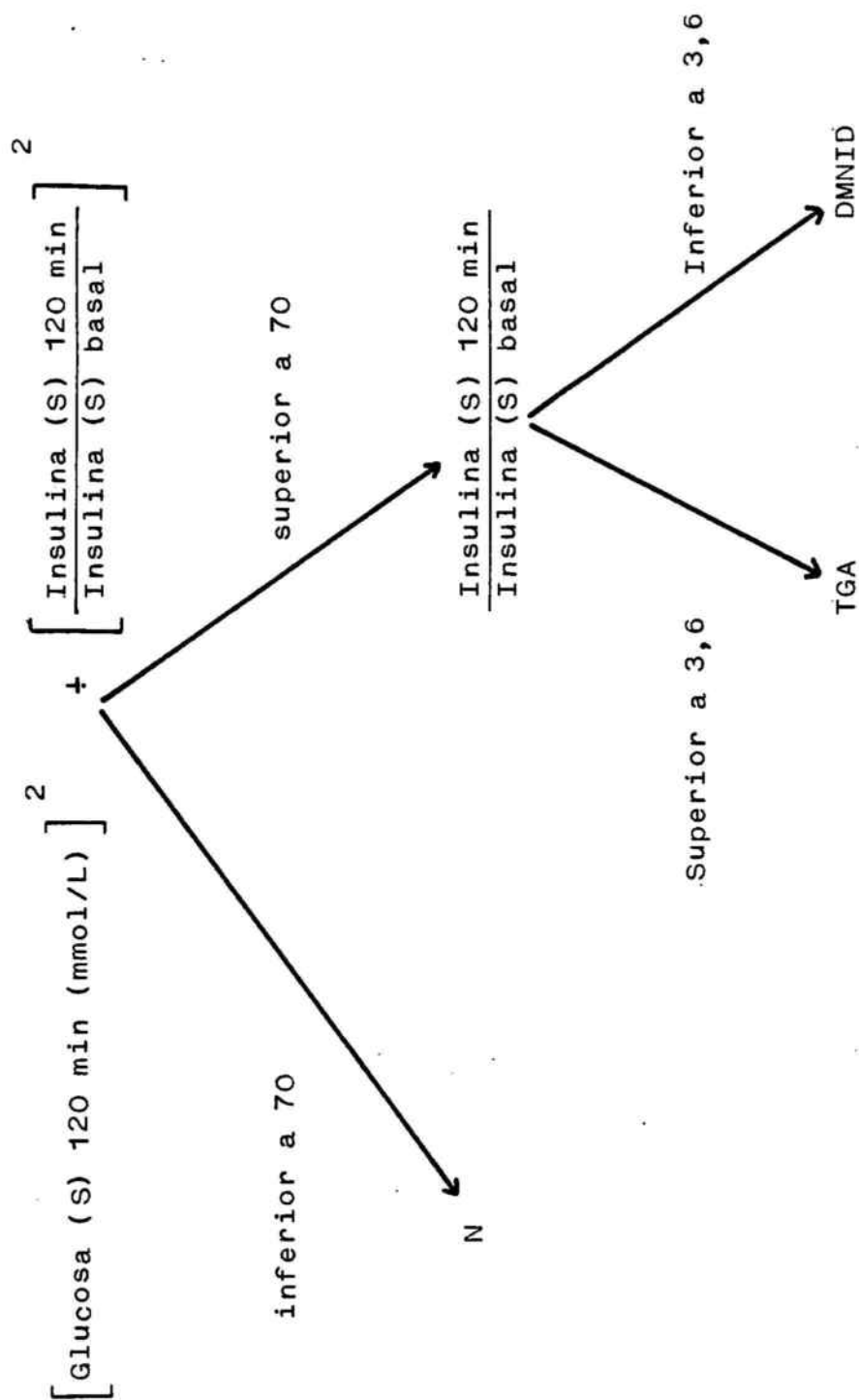


Figura 5.19. Algorisme que permet determinar a quin grup pertany un individu obès coneixent els valors de les concentracions sèriques de glucosa i insulina basal.

5.2.4. Concentració de triglicèrid sèric.

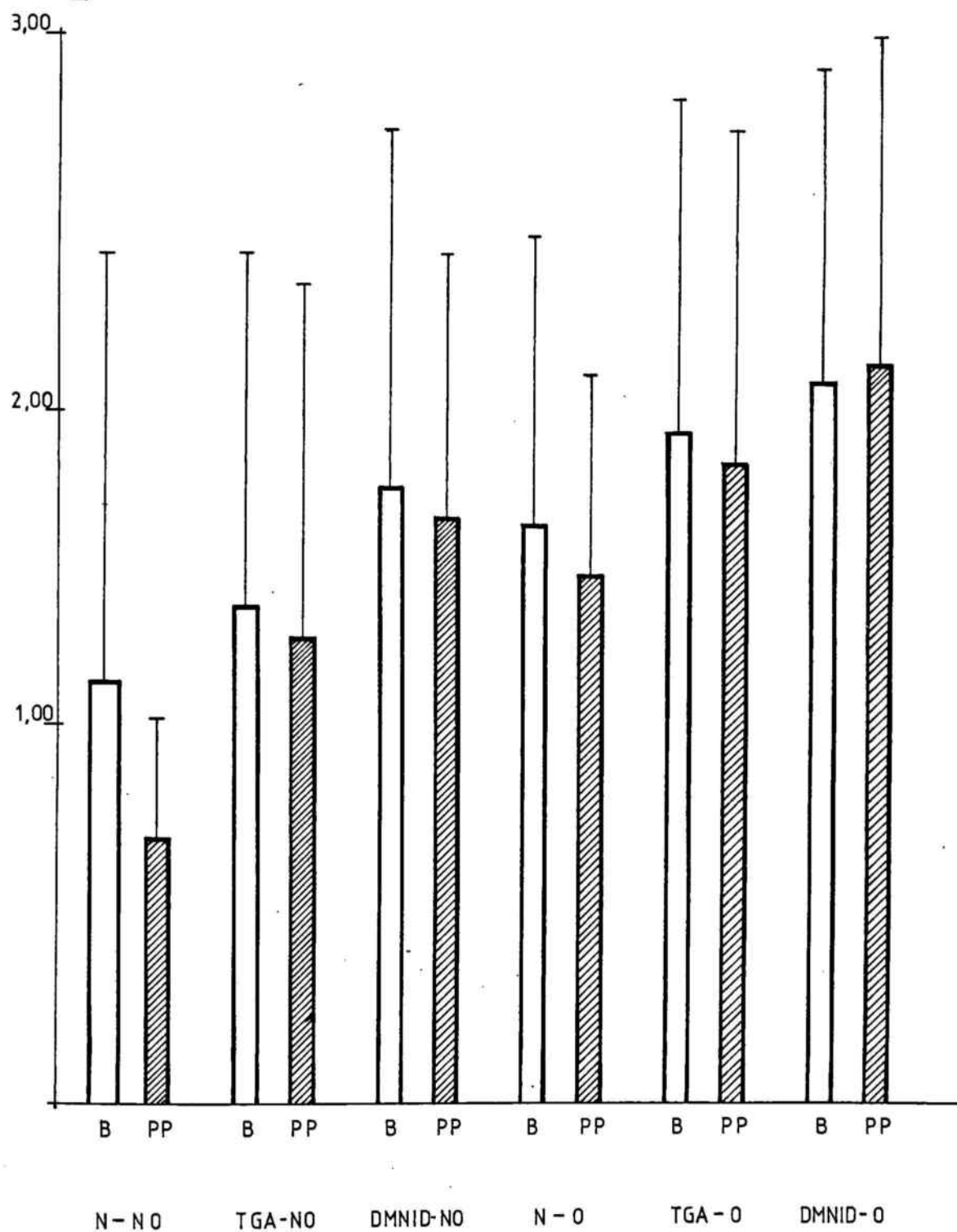
Els valors mitjans de la concentració de triglicèrid sèric en condicions basals i 120 minuts després de la ingestió de glucosa vénen representats en la figura 5.20. Tant en els subjectes obesos com en els no obesos del grup DMNID s'obtingueren uns valors generalment més elevats que els del grup TGA, els quals per la seva banda superaven els del grup format per persones normals. No obstant això, les diferències no foren estadísticament significatives, observant-se una considerable dispersió de valors individuals en tots els grups.

En el grup format per subjectes normals no obesos la comparació de la concentració de triglicèrid basal amb la dels 120 minuts, efectuada mitjançant la prova de la t de Student per a parells de valors, va donar com a resultat que als 120 minuts es produïa una disminució significativa. En els altres grups no es pogué detectar cap diferència estadísticament significativa.

5.2.5. Percentatge d'hemoglobina glucosilada.

Figura 5. 20. Valors mitjans de la concentració de triglicèrid sèric (diagrama de barres), més dues desviacions estàndard (línia perpendicular) en els subjectes no obesos (NO) i obesos (O) dels diferents grups, en condicions basals (B) i 120 minuts després de la ingestió de glucosa (PP).

mmol/L



Els valors del percentatge de la fracció glucosilada de l'hemoglobina (Hb A₁) foren significativament més alts en els grups DMNID, obesos i no obesos, que en els altres dos grups (Figura 5.21), entre els quals no es trobaren diferències estadísticament significatives.

La correlació entre el percentatge de Hb A₁ i la concentració d'insulina sèrica als 120 minuts fou bona en el grup DMNID, no obesos (Figura 5.22). L'equació de la recta de regressió obtinguda fou $y = - 0,02 x + 15,78$, amb un coeficient de correlació de 0,64, estadísticament significatiu ($p < 0,01$). El fet que el pendent fos negatiu indica que y i x eren inversament proporcionals. És a dir, com més baixa fos la insulina sèrica més alta resultaria l'hemoglobina glucosilada. En els altres grups la correlació no fou estadísticament significativa.

Figura 5. 21. Valors mitjans ($\pm$ dues desviacions estàndard) del percentatge d'hemoglobina glucosilada en els subjectes no obesos (NO) i obesos (O) dels diferents grups.

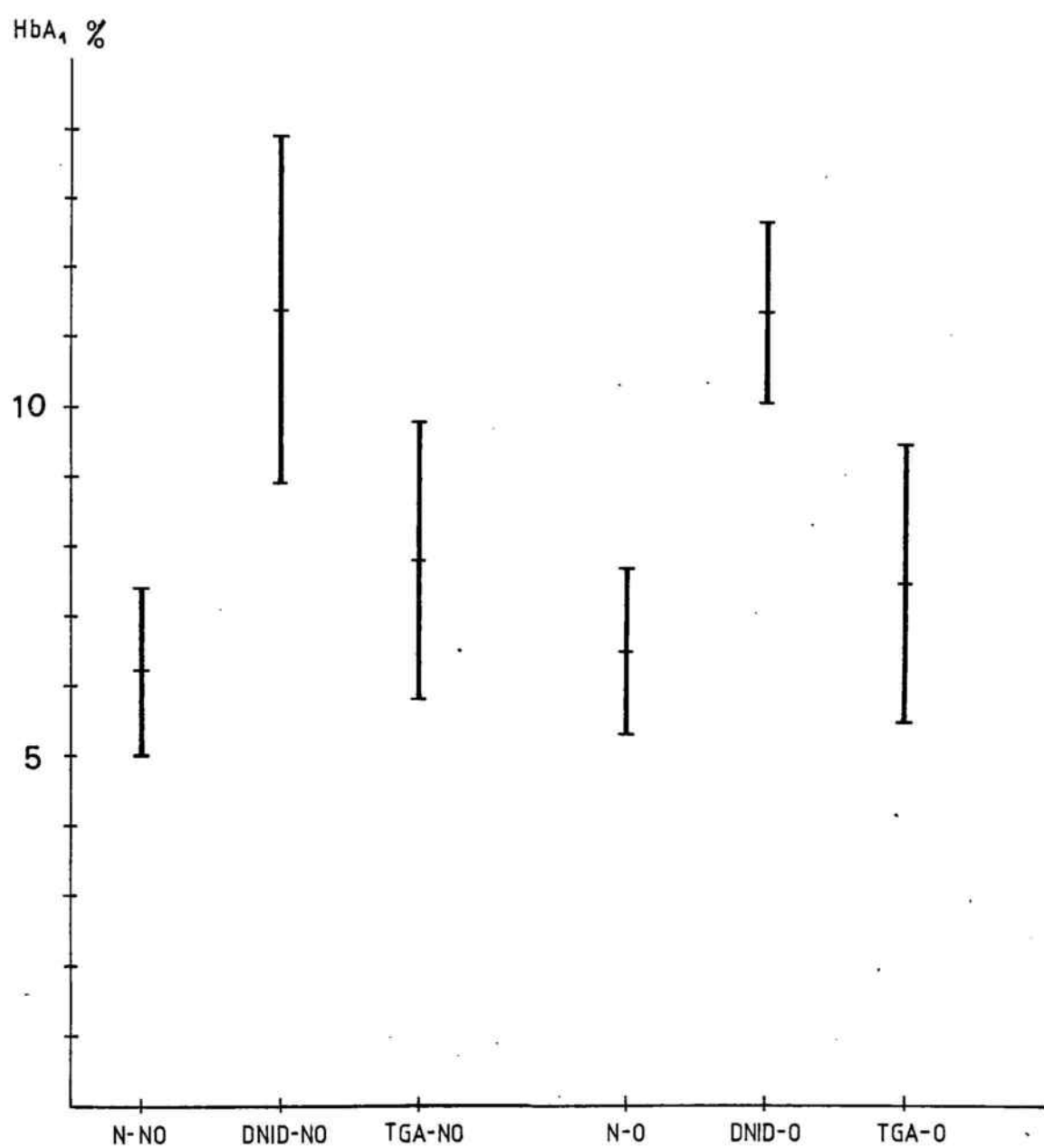
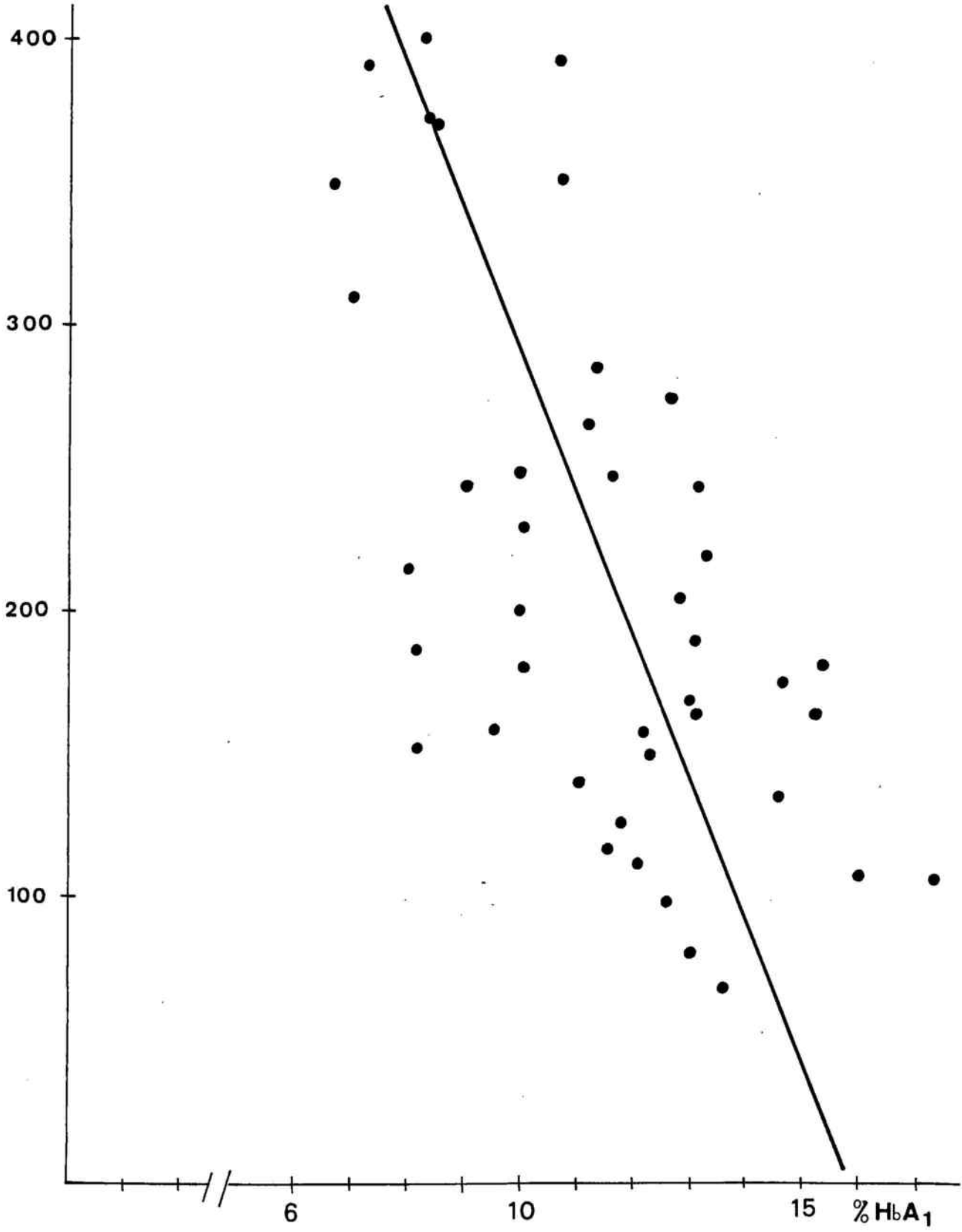


Figura 5. 22. Representació en un eix de coordenades dels punts originats per la insulina sèrica als 120 minuts (ordenades) i el percentatge d'hemoglobina glucosilada (abscisses) en el grup format per subjectes no obesos amb diabetis mellitus no insulino dependent.

pmol/L



6. D I S C U S S I O

L'estudi i avaluació de la tècnica enzimomunològica emprada en la determinació de la insulina sèrica tingué com a objectiu el coneixement de les característiques de les reaccions involucrades, amb la finalitat d'introduir-hi modificacions que millore - ssin la practicabilitat en funció de les peculiaritats del treball.

Malgrat que la insulina fou la primera substàn cia determinada per radioimmunoanàlisi (Yalow, 1.960), la determinació per enzimimmunoanàlisi, tot i que ha estat objecte de diverses comunicacions (O'Sullivan, 1.979), no ha fornit una bibliografia gaire abundosa. D'altra banda, la informació publicada sobre la mane - ra com actuen els diversos processos de les reaccions, així com els criteris de selecció dels mateixos és molt incompleta. L'any 1.976 el departament d'investigació de Boehringer Mannheim a Tutzig va posar a punt una tècnica immunoenzimàtica per a la determinació de la insulina sèrica basada en el principi ELISA (Kleinh - ammer, 1.976) que donava uns resultats molt ben corre lacionats amb la radioimmunoanàlisi. Poc després, la pròpia Boehringer Mannheim va comercialitzar un "kit" que incorporava aquesta metòdica, registrat amb el nom

Enzymun-Test^R Insulin. Els reactius que componen aquest equip foren el nucli dels utilitzats en el present treball.

El fet que en la enzimoimmunoanàlisi el marcador de la reacció sigui l'enzim conjugat a un antigen o a un anticòs i que el senyal mesurable sigui el canvi d'absorbància que té lloc com a conseqüència d'una reacció, va portar al planteig de quina és la cinètica d'aquesta reacció enzimàtica i de quina influència tenen les substències emprades com a substrats en la qualitat de la tècnica. Aquests punts no s'han tocat en les revisions més importants aparegudes (Wisdom, 1.976) (Oellerich, 1.979). La comparació de dues associacions diferents de substrat i cromogen a concentracions saturants (Figura 5.1), va permetre veure que en ambdós casos la cinètica era linial, més perllongada amb perborat i ABTS, però amb un pendent més pronunciat i una absorbància màxima superior amb peròxid d'hidrogen i diclorur d'ortofenilendiamina. L'avantatge d'emprar aquest substrat consisteix en el fet que en menys temps s'obté un senyal més gran, amb la qual cosa a més de reduir el temps d'incubació s'augmenta la sensibilitat ja que poden detectar-se quantitats

més reduïdes d'enzim. Per aixó s'utilitzà aquest substrat, encara que no aportés una millora substancial respecte l'altre.

La sensibilitat analítica del mètode, calculada en funció de la menor quantitat d'insulina capaç de donar una absorbància final no confusible amb la donada pel blanc de reactius, va resultar de 3,6 fmol per tub. Aquest valor cau dins del marge trobat per Kleinhammer, que era de 0,50-0,75 uU (3,5-5,2 fmol), per tub, tot i que s'havia calculat seguint un criteri diferent (Kleinhammer, 1.960). La coneixença d'aquest valor era necessària per a poder prendre una decissió sobre la proporció en què calia diluir el sèrum en tampó. Això havia de ser un compromís entre la sensibilitat de la tècnica i la mínima concentració d'insulina sèrica que calia que fos detectable, resultant que la màxima dilució que podia aplicarse era 1:13. Com que els tubs amb antiinsulina estaven dissenyats per a un volum total de 1,2 ml la dilució adoptada fou de 0,100 ml de sèrum en 1,1 ml de tampó, es a dir 1:12. El marge de medicació va abastar de 36 a 1440 pmol/L. Aquest límit superior és francament més alt que el de la tècnica Enzymun-Test^R Insulin original, que és de 857

pmol/L. Així s'evita l'haver de diluir el sèrum en els casos en què la concentració d'insulina sèrica sigui més alta, com passa en bona part de les insulinèmies postestímul dels subjectes estudiats.

La calibració va fer-se mitjançant una corba ajustable a una equació semilogarítmica (Figura 5.3). Això representa una millora en la practicabilitat ja que permet efectuar les interpolacions de les absorbàncies dels problemes utilitzant una calculadora que disposi del programa adequat.

L'estudi de les possibles interferències ocasionades per diverses substàncies sèriques a concentracions per damunt dels valors normals, va mostrar que no interferien substàncies reductores com l'urat i la glucosa, àdhuc als elevats nivells propis dels pacients amb diabetis mellitus. Mentre la bilirrubina no ocasionava interferència l'hemoglobina provocava descensos en la concentració d'insulina de més del trenta per cent. Aquesta interferència ha estat descrita en una tècnica enzimoinmunològica basada en el mètode del "sandwich" (Yoshioka, 1.979). La causa podria ser l'acció de la insulinasas alliberada pels eritròcits o bé

un impediment a l'acoblament entre insulina i anticòssos antiinsulina.

L'avaluació de l'exactitud es va efectuar comparant els valors obtinguts pel mètode proposat amb els del mètode de referència, que fou la radioimmunoanàlisi. L'examen de la recta de regressió mostra que amb el mètode proposat s'obtingueren valors sistemàticament més alts que els del mètode de referència, tot i que el terme independent de la recta era prou petit per a ser considerat important. El pendent, en canvi, no resultà diferent de la unitat, descartant-se per tant, desviacions sistemàtiques proporcionals. El coeficient de correlació ($r=0,952$) fou una mica inferior al reportat per Kleinhammer i col.laboradors ($r=0,980$). En una avaluació en què l'Enzymun-Test^R Insulin fou comparat amb el Insulin RIA-KIT^R de Bio-Mérieux (Richard, 1.981) els resultats foren molt menys satisfactoris ja que el coeficient de regressió fou més baix ($r=0,810$) ultra l'existència d'unes desviacions, constants i proporcionals. No obstant això, cal tenir en compte que els sèrums determinats en el treball darrerament esmentat tenien concentracions d'in-

ulina molt baixes, ja que corresponien a sang extrema en condicions basals. Podria, doncs, pensar-se que a aquests nivells la correlació és més feble.

En la mesura de la imprecisió intersèries s'obtingué un coeficient de variació del 12,3 % en alíquotes d'un "pool" de sèrums amb una concentració d'insulina de 540 pmol/L. Aquesta imprecisió és semblant a la reportada per altres autors amb aquest mètode (Kleinhammer, 1.976) o altres semblants (Yashioka, 1.979).

Dintre de les modificacions introduïdes en l'Enzymun Test^R Insulin cal esmentar que per a preparar les solucions estàndard va utilitzar-se insulina monocomponent humana valorada en unitats de massa. Com que la massa molecular relativa de la insulina és ben coneguda pogueren emprar-se unitats SI, en aquest cas pmol/L, amb tota garantia. Gairebé en la totalitat dels equips de reactius existents per a la determinació de la insulina, la calibració s'efectua amb estàndards valorats en unitats internacionals sense seguir, per tant, les recomanacions de la Federació Internacional de Química Clínica (EPTRV, 1.978) i de l'Organització Mundial de la Salut (World Health Organisation,

1.977) sobre unitats de mesura en biologia clínica i medicina en general.

En resum, pot dir-se que la tècnica proposada assoleix una notable practicabilitat i que tant la sensibilitat com el marge de mesura i la precisió, s'adapten a les necessitats de l'estudi. Pel que fa a l'exactitud, la correlació amb la radioimmunoanàlisi és força bona, amb el notable avantatge que suposa el no haver de manipular materials radioactius que comporten una sèrie d'inconvenients considerables, com ara aparells especials, personal especialitzat, permisos oficials, caducitats curtes, etcètera.

L'estudi del valor semiològic de la concentració d'insulina sèrica postestímul tingué com a complement ineludible el de la concentració de glucosa sèrica en el curs de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa. Els resultats reproduïren la coneguda ambigüitat d'aquesta prova, confirmant l'opinió que sosté que no pot ser utilitzada com a única prova bioquímica en l'exploració de la diabetis mellitus (Soeldner, 1.977). Deixant de banda la manca de reproductibilitat en un mateix individu i la dispersió de criteris sobre quina

és la frontera entre valors normals i patològics (2.3.4), la mesura de les concentracions de glucosa sèrica en el curs de la prova de sobrecàrrega oral de glucosa no és suficient per a poder diferenciar nivells o categories d'intolerància a la glucosa. Així, pogué constatar-se que els valors de les àrees de les corbes de glucèmia dels grups TGA i DMNID, obesos i no obesos, s'imbricaven extraordinàriament (Figures 5.9 i 5.10) i el mateix passava amb les concentracions de glucosa sèrica als 120 minuts de la ingestió de glucosa (Figures 5.11 i 5.12), encara que les mitjanes fossin significativament superiors en els grups DMNID. Això va indicar que a nivell de grup la intolerància a la glucosa estava relacionada amb la severitat de l'afecció, però sense que això fos vàlid cas per cas. Si per a classificar els subjectes en comptes de seguir els criteris emanats de la European Association for the Study of Diabetes en la seva reunió a Zagreb l'any 1.979 s'haguessin seguit els del National Institutes of Health dels Estats Units (2.3.4), els valors de la concentració de glucosa sèrica als 120 minuts haurien estat més resolutius ja que pot classificar-se com a diabètic un subjecte en funció de la tolerància a la glucosa, sense tenir en compte la concentració de

glucosa sèrica en condicions basals. Malgrat això, va preferir-se utilitzar un criteri que dificultés al màxim la classificació d'un subjecte com a diabètic basada només en valors de paràmetres bioquímics. Per això, el percentatge de subjectes classificats com a DMNID sense presentar signes clínics va ser relativament escàs. També hi hagueren algunes imbricacions entre els grups Normal i TGA, la qual cosa s'explica per la possibilitat que la concentració de glucosa sèrica als 120 minuts fos inferior a 7,8 mmol/L, per tant normals, però en canvi superior a 10,3 mmol/L als 60 minuts o a 9,2 mmol/L als 90 minuts, nivells a partir dels quals la tolerància ja es considera patològica segons els criteris seguits. Varen seguir-se els criteris de Fajans-Conn ja que presenten menys possibilitats d'ambigüitats que els del National Diabetes Data Group en els que els subjectes amb una concentració de glucosa sèrica inferior a 7,8 mmol/L als 120 minuts però superior a 11,1 mmol/L als 60 o 90 minuts queden sense classificar.

En treballs precedents realitzats pel nostre grup (Secció de Bioquímica Clínica del Servei d'Anàlisis Clíniques de l'Hospital de la Creu Roja de l'Hos-

pitalet) s'ha comunicat que la determinació de les concentracions sèriques de glucosa i insulina als 120 minuts assoleix en conjunt una resolutivitat més gran que la prova de tolerància a la glucosa oral en diferenciar per mitjans bioquímics els subjectes diabètics dels qui només pateixen intolerància i aquests dels qui no pateixen cap d'aquestes anomalies (Miró, 1.980, b i 1.981). Aquesta resolutivitat va quantificar-se mitjançant l'índex d'eficàcia diagnòstica diferencial (4.2.6) que va permetre comparar la capacitat de les diferents proves assajades per a discriminar els components de dos grups nosològicament diferents. Als índexs d'eficàcia diagnòstica diferencial trobats només s'els hi va considerar la seva capacitat de comparar entre diverses proves quina és més efectiva per a diferenciar els components de dos grups, sense pretendre que tinguessin una significació estadística més gran.

En els subjectes no obesos amb tolerància a la glucosa alterada la concentració d'insulina sèrica als 120 minuts fou significativament superior a la dels que patien diabetis no insulíndependent i, ensems, a la dels individus normals. Com es veurà més endavant,

aquesta observació concorda amb les de bon nombre de treballs previs, encara que amb enfoccs diferents. Com que la imbricació de valors individuals va ser poc important, l'índex d'eficàcia diagnòstica diferencial entre els grups TGA i DMNID fou de 0,90, molt superior als de 0,28 obtinguts amb la concentració de glucosa sèrica als 120 minuts i 0,17 amb l'àrea de la gràfica concentració de glucosa sèrica en front del temps (corba de glucèmia). Entre els grups TGA i Normal, l'índex d'eficàcia diagnòstica diferencial fou de 0,95, superior també als de 0,83 obtingut amb la concentració de glucosa sèrica als 120 minuts i 0,86 amb l'àrea de la corba de glucèmia.

Tornant als antecedents bibliogràfics abans esmentats, ja l'any 1.960 va veure's (Yalow, 1.960) que en casos de diabetis considerades inòcues, la resposta insulínica als trenta minuts de la sobrecàrrega oral de glucosa era inferior als valors normals, mentre que a les dues hores n'era superior. En un estudi portat a terme amb 501 subjectes (Chiles, 1.970), en les persones no obesas amb intolerància a la glucosa varen trobar-se altes concentracions d'insulina sèrica a les dues hores de la ingestió de glucosa, mentre que en

les que patien diabetis severa els nivells d'insulina sèrica als trenta minuts eren molt més baixos que en el grup de referència normal, tendint a igualar-se cap a les dues hores. Això anava a favor de la teoria que postula que la hipoglucèmia postprandial que acostuma a presentar-se en pacients amb diabetis benignes era deguda a una producció d'insulina demorada però excessiva (Seltzer, 1.956).

El valor semiològic de la resposta insulínica a la sobrecàrrega oral de glucosa s'ha interpretat de maneres contradictòries. Així, és molt extesa la consideració que la diabetis manifesta només s'acostuma a donar en pacients que prèviament havien presentat resposta insulínica disminuïda (Fajans, 1.974) (Kuzuya, 1.978). Segons Fajans (1.979) la resposta insulínica no dóna una informació adequada per a l'establiment d'una diagnosi, però en canvi té valor pronòstic. D'altres ho posen en dubte (Keen, 1.980). La manca de valor diagnòstic dels nivells d'insulina sèrica s'atribueix a una excessiva heterogeneïtat. Malgrat tot, cal tenir present que en els darrers anys la diabetis mellitus ha estat objecte de dues classificacions que estableixen grups o categories. La classificació de l'Or

ganització Mundial de la Salut de l'any 1.965 (WHO Expert Committee, 1.965) es basava sobre tot en la història natural de la malaltia, definint una sèrie d'estadis en funció de la severitat de la mateixa. La classificació del National Diabetes Data Group (National Diabetes Data Group, 1.979) és molt més precisa i té en compte, també, la naturalesa de l'afecció, establint una normativa clara que permet decidir a quin grup pertany cadascun dels subjectes considerats. En aquesta tesi els subjectes estudiats varen classificar-se segons aquestes definicions d'una manera sistemàtica, cosa que, òbviament, no era possible fer abans de la seva aparició.

El fet que les concentracions d'insulina sèrica als 120 minuts fossin significativament més altes en el grup TGA que en el DMNID, amb molt poques interseccions, va indicar que aquest paràmetre podria considerar-se un signe bioquímic diferencial entre aquestes dues categories d'intolerància a la glucosa. Una circumstància que podria explicar l'aparent contradicció entre els punts de vista de Fajans i la present tesi és que al parlar de resposta insulínica elevada o disminuïda es tenen en compte normalment les àrees

de les gràfiques, concentració d'insulina sèrica en front del temps (corba d'insulinèmia), o bé els índexs insulinogènics (Bagdade, 1.967). Aquí, en canvi, només es prengueren en consideració els valors puntuals de les concentracions sèriques de glucosa i insulina als 120 minuts, aspecte diferencial respecte els altres treballs.

En els subjectes obesos les concentracions d'insulina sèrica als 120 minuts foren molt més elevades que les dels normals no obesos. Això ja podia esperar-se degut a l'hiperinsulinisme propi de l'obesitat (Karam, 1.965). Dintre de cada grup la variabilitat fou gran i per això no pogueren apreciar-se diferències estadísticament significatives entre grups. Basat en el fet segons el qual quan les variacions individuals de la resposta insulínica vénen expressades en funció del percentatge de canvi respecte del nivell basal, els efectes de l'obesitat en la resposta insulínica queden eliminats (Bagdade, 1.971), va calcular-se l'índex $\text{insulina(S) } 120 \text{ min} / \text{insulina(S) basal}$. En el grup TGA aquest índex fou significativament més alt que en els altres dos. Al mateix temps la intersecció resultà poc acusada, de forma que l'índex d'eficàcia diagnòs-

tica diferencial entre els grups TGA i Normal fou de 0,80 i entre els grups TGA i DMNID de 0,96. Aquest darrer era ostensiblement millor que el de 0,28 obtingut amb les glucoses (5) 120 minuts i el de 0,33 amb les àrees de les corbes de glucèmia. D'aquesta manera un sector tan important de la població amb intolerància a la glucosa com és el de les persones obesas pogué prendre's en consideració.

L'elaboració de sengles algorismes, l'un per determinar de quin grup formava part un subjecte no obès, coneixent els valors de les concentracions sèriques de glucosa i insulina als 120 minuts de la ingestió de glucosa (Figura 5.18.) i l'altre per un subjecte obès amb els mateixos paràmetres ultra la insulina sèrica basal (Figura 5.19); possibilita la utilització d'aquests paràmetres per a establir diagnòsis diferencials entre diferents categories d'intolerància a la glucosa. Aquesta consideració cal matisar-la degudament, ja que si es segueixen les definicions del National Diabetes Data Group es donen pocs casos d'ambigüitat entre diabetis no insulíndependent i tolerància a la glucosa alterada. Per tant, el valor diagnòstic de la conjunció de glucosa i insulina sèriques

cal entendre que té interès en aquells casos en què les glucoses sèriques basal i postprandial no arriben a uns nivells prou alts per què s'hagin de considerar forçosament de diabetis i que, d'altra banda, la clínica és suggerent però no definitiva. Llavors, prenent en consideració el signe bioquímic de la conjunció dels valors de glucosa i insulina sèriques pot establir-se un diagnòstic. Això encaixa amb la conclusió a la que es va arribar a partir d'un estudi linial (Kosaka, 1.974) en el que de tots els pacients que al principi tenien diabetis dubtosa només esdevingueren autèntics diabètics els que des d'el primer moment havien presentat respostes insulíniques baixes. També és significatiu que en estudis realitzats amb indis Pima, entre els quals hi ha una bimodalitat molt marcada entre diabetis i intolerància a la glucosa (Dorf, 1.976) s'hagin trobat respostes insulíniques baixes només en els individus diabètics (Savage, 1.975).

Si hom considera que la diabetis mellitus no insulino dependent i la tolerància a la glucosa alterada són entitats nosològiques diferents encara que tinguin trets comuns, sobretot en les diabetis incipients, pot pensar-se que amb al mètode exposat la di

ferenciació podria fer-se abans. Això proporcionaria la possibilitat d'enfocar d'una manera més eficaç la prevenció i seguiment de la malaltia. Així s'evitaria el catalogar com a potencials diabètics aquelles persones que només presenten intolerància a la glucosa, cosa que moltes vegades ocasiona traumes injustificats. La majoria de vegades una dieta adequada podria ser suficient per a millorar la tolerància a la glucosa (Jackson, 1.974). D'altra banda, els qui pateixen diabetis no insulíndependent caldria que seguissin un control més rigurós i, tal vegada, medicació encara que els signes clínics fossin discrets (Forsham, 1.973).

Tot i que es coneix l'associació entre la hipertrigliceridèmia i la diabetis mellitus (Albrink, 1.974) no es pot negar la complexitat de la mateixa. Així, en les persones amb anomalies en la tolerància a la glucosa, en els diabètics no insulíndependents i en els diabètics insulíndependents la incidència d'hipertrigliceridèmia és més gran, bé que per causes diferents. En la intolerància a la glucosa, la hiperinsulinèmia associada sembla ser la causa d'una estimulació de la secreció hepàtica del triglicèrid unit

a lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL-triglicèrid) (Reaven, 1.967) (Bernstein, 1.978). En els casos de diabetis insulíndependent l'absència d'insulina sembla minvar l'acció de la lipoproteïna-lipasa en la seva missió de netejar el plasma de triglicèrid (Van Tol, 1.977). En els casos de diabetis no insulíndependent l'explicació sembla ser la mateixa, encara que no estigui tan clar (Greenfield, 1.980). També s'ha trobat una associació entre diabetis mellitus i el risc de malaltia isquèmica coronària (Righetti, 1.973). Al mateix temps, s'ha comprovat una major incidència de nivells de colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat (HDL-Colesterol) inferiors als normals en pacients diabètics (Lopes-Virella, 1.977). Les tres observacions lliguen perfectament ja que els nivells alts de triglicèrid sèric s'associen amb nivells baixos de HDL-Colesterol (Lewis, 1.980) i aquests amb un risc més elevat de patir una malaltia isquèmica coronària (Miller, 1.975). De totes maneres, la major incidència de nivells de triglicèrid sèric superiors als normals entre els diabètics no insulíndependents i les persones amb tolerància a la glucosa alterada, no implica necessàriament que hi hagi d'haver diferències estadísticament significatives entre les

concentracions de triglicèrid sèric d'aquests grups de persones i els individus normals. Així, en aquest treball la concentració mitjana de triglicèrid sèric basal fou més alta en el grup DMNID que en el grup TGA i en aquest, més alta que en el grup Normal (Figura 5.20). Així i tot, les diferències no foren estadísticament significatives degut a que el ventall de valors fou molt ampli.

La concentració de triglicèrid sèric als 120 minuts de la ingestió de glucosa és un paràmetre completament marginat de la literatura revisada. La seva introducció en aquesta tesi va donar uns resultats força interessants en el terreny biològic, si bé de dubtosa utilitat per a la diagnosi. El fet que en el grup de persones normals no obesas la concentració de triglicèrid sèric als 120 minuts fos inferior a la basal, mentre que en els altres dos grups constituïts per no obesos i en tots els grups formats per obesos això no pogué demostrar-se, va a favor de les possibles causes d'hipertrigliceridèmia esmentades abans. Així, podria pensar-se que en els individus normals l'estimulació de la secreció insulínica hauria causat indefectiblement una activació de la lipoproteïna-li

pasa, que complint amb la seva funció biològica hauria actuat disminuint la concentració de triglicèrid sèric. En canvi, en el grup DMNID, no obesos, la resposta insulínica hauria estat massa feble per a poder donar efectes notables. En el grup TGA, no obesos, així com en tots els grups formats per obesos la resposta insulínica fou molt alta i perllongada, per la qual cosa s'haurien pogut sobreposar d'una banda l'activació de la lipoproteïna-lipasa i de l'altre l'increment de la síntesi de VLDL-triglicèrid. En funció de quin fos l'efecte predominant s'hauria donat una disminució o un augment de la concentració de triglicèrid sèric. Així doncs, un increment de la concentració de triglicèrid sèric als 120 minuts respecte la concentració en condicions basals, podria indicar una hipersecreció insulínica lligada a l'obesitat o a la tolerància a la glucosa alterada i en tot cas descartaria un funcionalisme normal.

Els valors dels percentatges d'hemoglobina glucosilada foren significativament superiors en els grups DMNID, obesos i no obesos, que no pas en els altres (Figura 5.21). Això es correspon amb el criteri àmpliament difós segons el qual l'hemoglobina glucosi

lada és un reflex de la mitjana acumulativa de la concentració sèrica de glucosa (Maquart, 1.978). En els pacients amb diabetis manifesta la concentració de glucosa sèrica està elevada de forma contínua. D'altra banda, el fet de que els subjectes dels grups TGA no tinguessin unes hemoglobines glucosilades significativament diferents dels subjectes normals és una cosa comprensible, ja que la glucosa sèrica només s'eleva per damunt dels límits normals de forma intermitent.

En la literatura revisada van trobar-se descrites correlacions positives de l'hemoglobina glucosilada amb diversos paràmetres com ara la fletxa d'hiperglucèmia provocada (Koenig, 1.976 a) la glucosa sèrica en dejú (Graf, 1.977) , la glucosa en orina (Lanoe, 1.977), el triglicèrid sèric (Peterson, 1.977), el LDL-colesterol (Sosenko, 1.978), etcètera. En canvi, no se'n va trobar cap que la relacionés amb la resposta insulínica. Els resultats (Figura 5.22) mostren una correlació significativa entre l'hemoglobina glucosilada i la concentració d'insulina sèrica als 120 minuts en el grup DMNID, no obesos. El fet que en altres grups no es trobés cap correlació significativa

podria explicar-se, tant en els obesos com en els no obesos amb tolerància a la glucosa alterada, per la resposta insulínica elevada però ineficaç en la regulació del metabolisme dels carbohidrats. La relació inversa trobada en els diabètics no obesos és interessant ja que suggereix que hi ha una relació de proporcionalitat entre la baixa secreció d'insulina i el mal funcionament dels mecanismes reguladors de la concentració de glucosa sèrica. En altres paraules, si hom considera l'hemoglobina glucosilada com un bon marcador de la severitat de la diabetis en l'aspecte bioquímic (Koenig, 1.976 b), pot pensar-se que aquesta severitat depèn del nivell de la resposta insulínica. D'això es desprèn que la insulina sèrica als 120 minuts podria servir, també, com un marcador de la severitat d'una diabetis no insulíndependent.

7. CONCLUSIONS

- 1.- A les dues hores de la sobrecàrrega oral de glucosa les persones no diabètiques amb intolerància a la glucosa presenten una resposta insulínica superior a la normal.
- 2.- S'ha dissenyat un algorisme mitjançant el qual, el coneixement dels valors de la concentració de glucosa i insulina sèriques en una mostra obtinguda 120 minuts després d'una ingestió normalitzada de glucosa, és suficient per a poder saber amb una gran probabilitat d'encert si un subjecte pateix diabetis no insulíndependent, intolerància a la glucosa sense diabetis o cap de les dues circumstàncies.
- 3.- En el cas d'una clínica poc manifesta l'índex glucosa (S) 120 min/insulina (S) 120 min pot ser per als subjectes no obesos, un indicador eficaç per a diferenciar una diabetis no insulíndependent d'una intolerància a la glucosa idiopàtica o secundària a altres trastorns. Per als subjectes obesos l'índex insulina (S) 120 min/insulina (S) basal pot acomplir la mateixa funció, bé que amb un risc d'error més gran.

- 4.- La informació que pot obtenir-se dels valors de la glucosa i insulina sèriques als 120 minuts de la ingestió de glucosa, (més la insulina sèrica basal en els obesos), té més eficàcia diagnòstica que la prova de tolerància a la glucosa oral que té poca especificitat.
- 5.- En les persones normals no obeses la trigliceridèmia als 120 minuts de la ingestió de glucosa sempre és inferior a la basal. En les persones que presenten obesitat, intolerància a la glucosa o diabetis no insulíndependent acostuma a ser superior.
- 6.- En els diabètics no insulíndependents no obesos es dóna una relació de proporcionalitat inversa entre l'hemoglobina glucosilada i la insulina sèrica als 120 minuts de la ingestió de glucosa. Això vol dir que com més gran sigui la severitat de la diabetis més baixa serà la insulina sèrica als 120 minuts.
- 7.- Amb les modificacions introduïdes a l'enzimoimmu

noanàlisi d'insulina es millora la practicabilitat del mètode ja que s'aconsegueix un marge de medicació més gran, apte per a la quantificació dels elevats nivells post-estímul.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Abel, J. et al., (1926), Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)
12, 132.

Abel, J. et al., (1927), J. Pharmacol. Exp. Ther., 31,
65.

Albrink, M.J. et al., (1974), Diabetes 23, 913.

Archer, J.A. et al., (1973), J. Clin. Endocrinol. Met.
36, 65.

Assimakopoulos-Jannet, F. i Jeanrenaud, B., (1976), J.
Clin. Endocrinol. Met., 5, 337.

Avrameas, S., (1976), Methods Enzymol., 44, 709.

Avrameas, S., (1969), Immunochemistry, 6. 43.

Bagdade, J.D. et al., (1967), J. Clin. Invest., 46,
1549.

Bagdade, J.D. et al., (1971), Metabolism, 20, 1000.

- Banting, F.G. i Best, C.H., (1922), J.Clin. Lab. Med., 7, 251.
- Baruch, C. et al., (1973). Med. Clin. N. Amer. 57, 1441.
- Beck, P. et al., (1964), J. Lab. Clin. Med., 64, 654.
- Bellman, O. i Hartmann, E., (1975), Am. J. Obstet. Gynecol., 122, 829.
- Bernett, P.H. et al., (1976), Rec. Prog. Horm. Res., 32, 333.
- Berstein, R.M. et al., (1978), Diabetologia, 14, 249.
- Birmingham Diabetes Survey Working Party, (1962), Brit. Med. J., I, 1497.
- Blecher, J. et al., (1977), Mol. Cell. Endocrinol., 8, 301.
- Bordes, R. et al., (1979), Laboratorio, 67, 123.
- Bunn, H.F. et al., (1976), J. Clin. Invest., 57, 1652.

- Burckhardt, H. et al., (1972), *Helv. Med. Acta*, 36, 277.
- Butcher, R. W. et al., (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 1651.
- Butterfield, W.J. et al., (1965), *Metabolism*, 14, 851.
- Carew, T.E. et al., (1976), *Lancet*, 1, 1315.
- Chiles, R. i Tzagournis, M., (1970), *Diabetes*, 19, 458.
- Clark, B.R. i Engvall, E., (1980), *Enzyme-Immunoassay* (E.T. Maggio), cap 8, CRC Press Inc.
- Cohen, H. i Horowitz, M., (1968), *Amer. Clin. Nutr.* 21, 407.
- Colowick, S.P. et al., (1947), *J. Bio. Chem.*, 168, 583.
- Conn, J.W., (1965), *New. Engl. J. Med.*, 273, 1135.
- Coore, H.G. et al., (1971), *Biochem. J.*, 125, 115.

Craig, J. W. et al., (1969), Biochem. Biophys. Acta, 177, 213.

Creutzfeldt, W. et al., (1976), The Genetics of Diabetes Mellitus. Springer-Verlag.

Cuatrecases, P., (1959), Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 63, 450.

Cuatrecases, P., (1971), Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 68, 1264.

Cuatrecases, P., (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.), 69, 138.

Damosky, T.S. et al., (1973), Diabetes, 14, 672.

Davidson, M.B., (1972), Diabetes, 21, 6.

Dieterle, J. et al., (1969), Med. Klin., 64, 489.

Dieterle, J. et al., (1970), Pediatrics, 46, 54.

Dillon, D. i Mcwr M., (1965), Diabetes, 14, 672.

Dix, D. et al., (1978), Clin. Chem., 24, 2073.

Dixon, W.J., (1953), Biometrics, 9, 74.

Dolhofer, R. i Wieland, D.H., (1978), F.E.B.S. letters, 85, 86.

Dollery, C.T., (1971), Täg1. Prax., 12, 161.

Dorf, A. et al., (1976), Diabetes, 25, 554.

Drenick, H. i Johnson, J., Amer. Clin. Nutr., 28, 264.

Ducimetière, P. et al., (1980), Diabetologia, 19, 205.

Dymock, C. i Williams, H. (1971), Postgrad. Med. J.

47, 49.

Emmer, J. et al., (1971), Med. Clin. N. Amer., 55, 1076.

Ensick, J.W. et al., (1976), Diabetes, 16, 289.

Engvall. E. i Perlman, P. (1971), Immunochemistry, 8 871.

Expert Panel on the Theory of Reference Values (EPTRV) (1978), Clin. Chim. Acta, 87, 461 F.

Exton, J.H. et al., (1970), Rec. Prog. Horm. Res., 26, 411.

Fajans, S.S. i Conn, J.W. (1965), Excerpta Medica Intl. Cong. Ser., 84, 641.

Fajans, S.S., (1971), Med. Clin. N. Amer., 55, 793.

Fajans, S. S., (1974), Trans. Amer. Phycns., 87, 83.

Fajans, S.S. et al., (1976), Arch. Intern. Med., 136, 194.

Fajans, S.S., (1979), Endocrinology (De Groot), vol. 2, pàg. 1007. Grüne & Stratton.

Felig, P., (1971), Med. Clin. N. Amer., 55, 821.

Fitzgerald, M.G. i Keen, H., (1964), Brit. Med. J., 1, 1568.

Flier, K. et al., (1975), Science, 190.

Floyd, J.C. et al., (1967), J. Clin. Invest., 45, 198.

Forsham, P.H., (1973), West.J. Med., 119, 60.

Frank, B.H. i Veros, A.J., (1968), Biochem. Biophys. Res. Comm., 32, 155.

Freinkel, N. i Goodner, C.J., (1962), Arch. Intern. Med., 109, 235.

Frienlander, E.C., (1960), Arch. Intern. Med., 136, 194.

Fuentes, J. i Alsina, M.J., (1982), Ann. Biol. Clin., 40, 195.

Galen, R.S. i Gambino, S.R. (1975). Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses. John Wiley & Sons.

Gavin, R. et al., (1973), J. Biol. Chem., 248, 2202.

Gavin, R. et al., (1974), Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 71, 84.

Goldberg, N.D. et al., (1967), Biochem. Biophys. Acta, 148, 665.

Gonent, B. et al., (1977), Lancet ii, 8041, 734.

Gordon, D.L. i Schwarz, M.S., (1971), Ann. Phar. Phys., 3, 110.

Gordon, T., (1964), Glucose Tolerance of Adults. National Center for Health Statistics, U.S. Public Health Service Series, 11 N° 2.

Graf., R. i Porte Jr., D., (1977), 37 th Annual Meeting of the American Diabetes Association, Saint-Louis, 1977.

Greenfield, M. et al., (1980), Diabetologia, 18, 441.

Haist, R.E., (1944), Physiol. Rev., 24, 409.

Hamper, H. et al., (1970), Arch. Intern. Med., 126, 870.

Helderman, J.H. i Raskin, P.R., (1980), Diabetes, 29 551.

Hendry, R.M. i Herrman, J.E., (1980), J. Immunol. Meth., 35, 285.

Howanitz, P.J. i Howanitz J.H., (1979), Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, cap 7 (J.B. Henry). W.B. Saunders Company.

Huang, S.W. i MacLaren, N.K., (1976), Science, 192, 65.

Hutching, J. et al., (1966), Ann. Intern. Med., 126, 870.

Irvine, J. et al., (1977), Diabetes, 26, 138.

Jackson, W.P.U., (1974), Proceedings of the VIII
Cong. DF. Malaisse, W.J. Excerpta Medica, p. 639.

Jahnke, K. i Bruno J., (1970), Verh. Dtsch. Ges. Med.
76, 359.

Janieson, J.D. i G.E. Paladie, G.E., (1967), J. Cell.
Biol., 34, 177.

Jarret, R.J. i AlSayeah, H., (1978), Diabetologia, 15
243.

Jeanrenaud, B., (1979), Diabetologia, 17, 133.

Johansen, R i Ørnsholt, H., (1972), Metabolism, 21,
291.

Joslin, E.P., (1959), Diabetic Manual for the Patient,
10 th ed. Lea and Febriger.

Kalant, N., (1956), Arch. Biochem. Biophys., 65, 469.

Kammerer, L. et al., (1970), Diabetologia, 6, 473.

Karam, J.H. et al., (1965), Lancet, 1, 286.

Keen, H. et al., (1979), Diabetologia, 16, 283.

Keen, H., (1980), Diabetologia, 19, 165.

Ketterer, B. et al., (1957), Ergebnisse der Physiol.,
49, 127.

Klimt, C. et al., (1969), Diabetes, 18, 299.

Kobberling, J. i Creutzfeldt, W. (1970), Diabetes, 19
870.

Kobberling, J. i Creutzfeldt, W. (1979), Diabetologia,
17, 273.

Koenig, R.J. et al., (1976 a), N. Eng. J. Med., 295,
417.

Koenig, R.J. et al., (1976 b), Diabetes, 25, 230.

Komer, A., (1965), Rec. Prog. Horm. Res., 21, 205.

Kosaka, K. et al., (1974), Diabetologia, 10, 775.

Krebs, A.H., (1966), Adv. Enz. Reg., 4, 339.

Knowlton, F.P. i Starling, E.H., (1912), J. Physiol. 45, 146.

Kuzuya, N., Proinsulin, Insulin, C-Peptide p. 3 (S. Baba, T. Kaneko, N. Yanaihara). Excerpta Medica International Congress Series (1978).

Lancet, R. et al., (1977), Lancet, 2, 1156.

Lehtonen, O.P. i Viljanen, M.K., (1980 (1)), J. Immunol. Meth., 36, 63.

Lehtonen, O.P., (1980 (2)), J. Immunol. Meth., 34, 61.

Leichter, R. et al., (1975), Amer. J. Med., 58, 285.

- Lendrum, H. et al., (1975), Lancet, I, 880.
- Levin, M. E., (1968), Med. Clin. N. Amer., 52, 295.
- Levin, M.E. et al., (1972), Diabetes, 21, 856.
- Levine, R., (1965), Fed. Proc., 24, 1071.
- Levine, R. et al., (1-50), Amer. J. Physiol., 163, 70.
- Lewis, B., (1980), Annual Review of Clinical Chemistry p. 139 (D.M. Goldberg). John Wiley & Sons.
- Lindt, J,N., (1973), Brit. Med. J., 3 , 320.
- Loten, E. G. i Sneyd, J.G.T., (1970), Biochem. J., 120, 187.
- Lopes-Virella, M.F.L., (1977), Diabetologia, 13, 285.
- Maggio, E.T. (1980), Enzyme-Immunoassay p.68, CRC Press Inc.

- Mac Donald, M.J., (1974), *Diabetologia*, 10, 707.
- Mako, M.E. et al., (1973), *Clin. Res.* 21, 631.
- Maquart, F.X., (1978), *Ann. Biol. Clin.*, 36, 467.
- Meriwether, J. i Goodman, G., (1972), *Amer. J. Med.* 53, 505.
- Miller, G.J. i Miller, N. E., (1975), *Lancet*, I, 16.
- Milunsky, M. et al., (1971), *Amer. J. Dis. Child.*, 121, 15.
- Miró, J. i Fuentes, J., (1980 a), *Biometrica*, 4 , 121.
- Miró, J. i Fuentes, J., (1980 b), *Séptimas Jornadas Diabetológicas* p. 162. L.A.C.R.E.
- Miró, J. i Fuentes, J., (1981), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 19, 773.
- Modan, H. et al., (1975), *J. Med. Ass.*, 233, 266.

Morgan, H. E. et al., (1959), Biochem. J., 73, 573.

Munger, B.L., (1958), Amer. J. Anat., 103, 275.

Nakame, P.K. i Kawari, A. (1974), J. Histochem. Cytochem., 22, 1084.

National Diabetes Data Group, (1979), Diabetes, 28
1039.

Nelson, D.A., (1979), Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods p. 858, (J. B. Henry). W. B. Saunders Company.

Nerup, J. et al., (1976), Acta Endocrinol., 205, 167.

Newsholme, E.A. i Randle, P.J. (1964), Biochem. J., 93, 641.

Newsholme. E.A. i Start, A.C. Regulation in Metabolism
ap. 4. John Wiley & Sons.

Nikkilä, E.H., (1977), Diabetes, 26, 11.

Notkins. A.L., (1980), Investigación y Ciencia, 40, 16.

Oellerich, M., (1980), J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 18, 197.

O'Sullivan, J.M. i Mahan, C.M., (1968), N. Engl. J. Med., 278, 1038.

O'Sullivan, J.M. i Mahan, C. M., (1964), Diabetes, 13, 278.

O'Sullivan, J.M., (1971), J. Reprod. Med., 7, 21.

O'Sullivan, J.M., (1973), J. Obstet, Gynecol., 116, 901.

O'Sullivan, J.M., (1979), Ann. Clin. Biochem., 16, 221.

Porte, D., (1969), Arch. Intern. Med., 123, 252.

Passey, R.B. et al., (1977), Clin. Chem., 23, 131.

- Peterson, C.M. et al., (1977), *Diabetes*, 26, 507.
- Porte, D., (1969), *Arch. Intern. Med.*, 123, 252.
- Pykälistö, O.J., (1975), *J. Clin. Invest.*, 56, 1108.
- Quereda, C. et al., (1977), *Rev. Clin. Esp.*, 147, 15.
- Randle, P.J. i Morgan, H.E., (1962), *Vitamines and Hormones*, 20, 199.
- Randle, P. S. i Smith, G.H., (1958), *Biochem. J.*, 5, 70.
- Reaven, G.M. et al., (1974), *Am. Med. J.*, 57, 551.
- Remein, Q.M. i Wilkerson, H.L.C., (1961), *J. Chronic Dis.* 13, 6.
- Richerd, L. i Ruitton-Uglienco, A., (1981), *Ann. Biol. Chem.*, 39, 295.

Righetti, A. et al., (1973), Schweiz. Med. Wochenschr. 103, 668.

Rimoin, D.L., (1971), Med. Clin. North. Amer., 55, 807.

Risser, T.P. et al., (1978), Diabetes, 27, 902.

Ross, C. i Tzagournis, M., (1970), Diabetes, 19, 458.

Ross, M.E. et al., (1976), Diabetes, 25, 190.

Roth, J., (1973), Metabolism, 22, 1051.

Rubinstein, A.H. et al., (1970), Diabetes, 19, 546.

Russel, M. et al., (1975), Brit. Med. J., 1, 10.

Sailer, S. et al., (1968), Schweiz. Med. Wochenschr., 98, 1512.

Salans, S. et al., (1968), J. Clin. Invest. 47, 153.

- Salans, S. et al., (1971), J. Clin. Invest. 50, 1399.
- Sandek, C.D. i Eder, H.A., (1979), Am. Med. J., 66, 843.
- Sanger, F. et al., (1955), Biochem. J., 59, 509.
- Savage, P.J. et al., (1975), Diabetes, 24, 362.
- Schteingart, D. i Conn, J. (1965), Ann. N.Y. Acad. Sci., 131, 388.
- Seltzer, H.S. et al., (1956), Diabetes, 5, 437.
- Seltzer, H.S. et al., (1967), J. Clin. Invest. 46, 323.
- Sharp, C.L. et al., (1964), Proc. R. Soc. Med., 57, 193.
- Sherman, L., (1966), Diabetes, 15, 169.
- Siegenthaler, W., (1977), Fisiopatología Clínica p. 61. Editorial Toray.

Sindall, A. et al., (1971), J. Clin. End. 32, 653.

Soeldner, J.S. i Park, B.N., (1977), New Concepts in Endocrinology and Metabolism p. 107 (L.I.Rose i R.L. Lavine). Grüne and Stratton, Inc.

Sorge, F. et al., (1975), Horm. Met. Res., 7, 118.

Sosenko, S. et al., (1978), (1978), 38 th Meeting American Diabetes Association, Boston.

Spitz, S. et al., (1970), Quart. J. Med. 39, 201.

Stalder, M. et al., (1981), Diabetologia, 21, 544.

Steiner, D.F. i King, J., (1964), J. Biol. Med., 293, 1292.

Steiner, D.F. i Oyer, P. E., (1967), Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 57, 973.

Steiner, D.F. et al., (1969), Rec. Prog. Horm. Res., 25, 207.

Steiner, D.F. et al., (1972), Handbook of Physiology
p. 175. The Williams and Wilkins.

Steinberg, S. et al., (1959), Clin. Res. 7, 250.

Stevens, V.J. et al., (1977), J. Biol. Chem., 9, 2998.

Stone, D.B. i Bowr, J.D., (1970), Curr. Med. Diagn.
37, 740.

Stowers, J.M., (1975), Complications of Diabetes p.
213 (H. Keen i J. Jarret). Edward Arnold.

Sutherland, E.W. i de Duve, C., (1948), J. Biol. Chem.
175, 663.

Sutherland, E.W. et al., (1965), Rec. Prog. Horm. Res.
21, 623.

Svejgaard, A., (1976), Acta Endocrinol.(KBH), 83, 77.

Swartz, D., (1975), Méthodes Statistiques à l'usage des
Médecins et des Biologistes. Flammarion.

Tashkinen, M.R. i Nikkilä, E.A., (1979), Diabetologia 17, 351.

Tattersall, R.B. i Fajans, S.S., (1975), Diabetes, 24, 44.

Trivelli, L.A. et al., (1971), N. Engl. J. Med., 284, 353.

Vallance-Owen, J., (1964), Adv. Met. Dis., 4, 229.

Vallance-Owen, J. et al., (1958), Lancet ii, 336.

Van Tol, A., (1977), Atherosclerosis, 26, 117.

Velasco, C.A. et al., (1973), Clin. Chem. 19, 201.

Villar-Palasi, C. i Wenger, J.I., (1967), Fed. Proc., 26, 563.

Walhfeld, A.W., (1974), Methoden der Enzymatischen Analyse p. 1087. H.U. Bergmeyer.

Weber, G. et al., (1965), Fed. Proc., 24, 948.

Weemen, B.K. van i Schnurs, A.H.W.M., (1971), FEBS Letters, 15, 232.

West, K.M., (1978), The Epidemiology of Diabetes p. 94. Elsevier.

W H O Expert Committee on Diabetes Mellitus, (1965), WHO Tech.Rep. Ser., 310, 12.

W H O, (1977), The SI for health profesions, WHA, 33, 39.

W H O Expert Committee on Diabetes Mellitus Second Report, (1980), WHO Tech. Rep. Ser. n° 644.

Wilmore, W. et al., (1974), Lancet I, 73.

Wing, D.R. i Robinson, D.S., (1968), Biochem. J., 109, 841.

Wisdom, G.B., (1976), Clin.Chem. 22, 1243.

Yalow, R.S. i Berson, S.A., (1960), J. Clin. Invest.,
39, 1157.

Yoshioka, M. et al., (1979), Clin. Chem., 25, 35.

Zimmet, P. i Whitehouse, S., (1978), Diabetes, 27,
793.

Zonana, J i Rimoin, D.L., (1976), N. Engl. J. Med.,
295, 603.