

Estudios sobre la Secreción de Insulina

Investigador Principal: Dr. *Bernardo Reyes Leal* *
Investigadores Asociados: Drs. *Eduardo Bernal Hernández* **
Augusto Castro ***
Orlando Guardiola ****

Facultad de Medicina, Universidad Nacional. Bogotá.

INTRODUCCION

El problema de la Diabetes Mellitus en nuestro país como en el resto del mundo es sin lugar a dudas el más importante problema de salud que debe afrontar el médico en el momento actual.

No se trata simplemente de pensar en el diabético clásico con su cortejo de comas, insulina, amputaciones o problemas visuales; se trata también de la etiología del infarto del miocardio y la obesidad muy posiblemente relacionadas con lo que llamamos Diabetes y que constituyen las mayores causas de mortalidad en esta parte del siglo.

La gravedad de la diabetes proviene de que desconocemos su etiología. A pesar de los múltiples laboratorios

de investigación dedicados al estudio de este problema, tanto su etiología como su fisio-patología son desconocidas.

Desde el año de 1965 nuestra sección ha venido considerando los mecanismos de secreción de la Insulina como su principal programa de investigación.

Lo que sigue es simplemente el resumen de lo logrado hasta ahora. Sobre decir que es imposible, y tal vez inapropiado incluir en este tipo de presentación las dificultades que se han presentado para llegar a los resultados actuales.

En los últimos diez años la práctica del Radioinmuno-Análisis para la dosificación de hormonas proteicas ha permitido una comprensión mucho

* Profesor Asociado. Jefe Sección Endocrinología y Medicina Nuclear.
** Instructor Asociado.
*** Profesor Asistente.
**** Instructor Asociado.

mejor de la mayoría de los sistemas de homeostasis o adaptación en las cuales toman parte dichas sustancias. El Radioinmuno-Análisis, en efecto, nos permite medir los niveles fisiológicos de estas hormonas -algo prácticamente imposible por los métodos biológicos- y por lo tanto apreciar sus variaciones en frente a cualquier estímulo endógeno o exógeno.

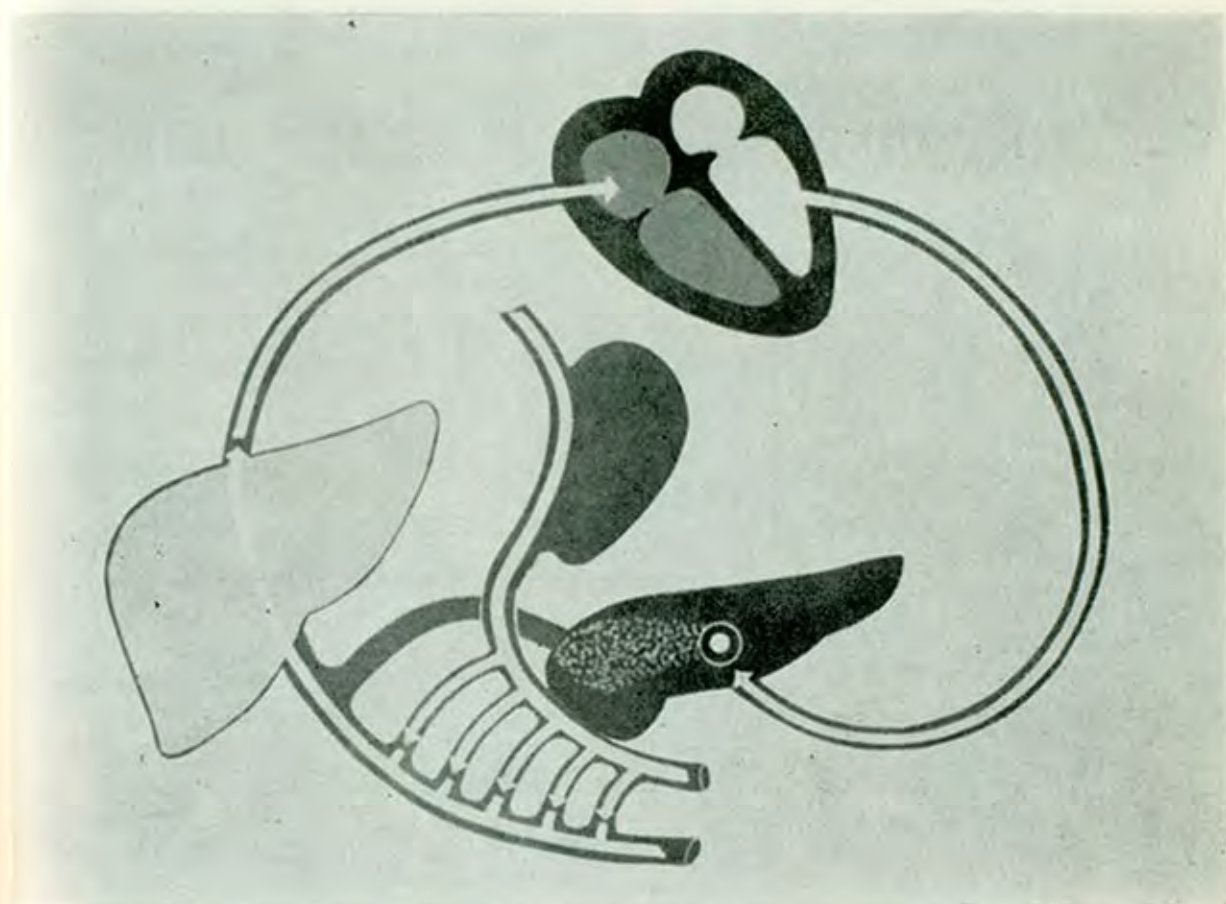
Todo esto es particularmente cierto para la Insulina y todo lo relacionado con el Metabolismo intermedio. Sin embargo por razones obvias, la mayoría de los estudios "in vivo" que incluyen la medida de niveles plasmáticos de Insulina se basan en medidas realizadas en sangre periférica, es decir apreciando los niveles plasmáticos de esta hormona después de su paso a través del hígado. Puesto que el hígado es uno de los más importantes órganos "blanco" de la Insulina es de suponer que esta sufra una transformación ya sea en su estructura, ya sea en su cantidad absoluta al atravesarlo y ejercer una acción hormonal a su nivel.

Desde hace varios años venimos realizando la medida de la Insulina plasmática en Vena Porta, según el protocolo que explicamos en detalle, y los resultados obtenidos parecen confirmar la idea expuesta.

Con el objeto de hacer más clara esta presentación resumiremos, en forma breve, la serie de experimentos que nos ha llevado hasta el estado actual.

Nuestro interés por este problema comenzó desde 1968 estudiando el perfil de hiperglicemia obtenido después de administración oral de glucosa en un gran número de sujetos cuyos valores estaban comprendidos dentro de lo considerado como normal. Nos llamaba la atención la diferencia entre los picos de hiperglicemia encontrados como si la función glicogénica de unos fuera más capaz de almacenar la glucosa ingerida. Comenzamos entonces a estudiar los diferentes pasos que, desde la absorción oral de glucosa llevan a su almacenamiento hepático.

En la figura No. 1 podemos ver cómo, según la teoría clásica, se sucedían tales pasos. La glucosa llegando al Duodeno pasaría a través de la pared intestinal a las ramas de la Vena Porta, luego atravesaba el hígado y la ola de hiperglicemia venía a estimular la liberación de Insulina por el Páncreas; este a su vez libera la Insulina que permitiría el almacenamiento de glucosa en el hígado. Algo, en esta secuencia de hechos parecía ilógico ya que la glucosa debía pasar por el hígado dos veces antes de ser almacenada; por otra parte la ola inicial de hiperglicemia periférica, independiente de la liberación de Insulina, debía ser igual en todos los sujetos, normales o diabéticos. Vino entonces a nuestra memoria un hecho hallado durante el establecimiento de los valores normales de glicemia después de ingestión oral de glucosa en relación con sus variaciones según la edad. En la figura No. 2 vemos en forma gráfica tal hecho. Los valores

Fig. N^o 1

hallados en sujetos jóvenes, entre 20 y 25 años de edad son estadísticamente más bajos que los hallados en una población general sin distinción de edad.

Esto confirmaba nuestra idea de una diferencia de fijación hepática de la ola de hiperglicemia inicial. Como si, una vez más, el hígado del sujeto joven tuviese una función glicogénica más eficaz.

Fue entonces cuando comenzamos a interesarnos en el posible papel de las hormonas duodenales y después de revisar prácticamente toda la literatura existente, en 1968, al respecto, tres hechos nos parecieron suficiente-

mente importantes como para servir de base a una nueva hipótesis para explicar los pasos que llevan al almacenamiento hepático de la glucosa oral.

Tales hechos son: a) en primer lugar el descrito inicialmente por Co-nard y Col. (1) en animales no anes-tesiados y luego por McIntyre y Col. (2) en sujetos humanos. Tales auto-res hallaron que los niveles de Insu-linemia periférica después de glucosa oral son mucho más elevados que aquellos obtenidos después de infu-sión IV de glucosa.

Tal hecho es tanto más interesante si se considera que los niveles de gli-

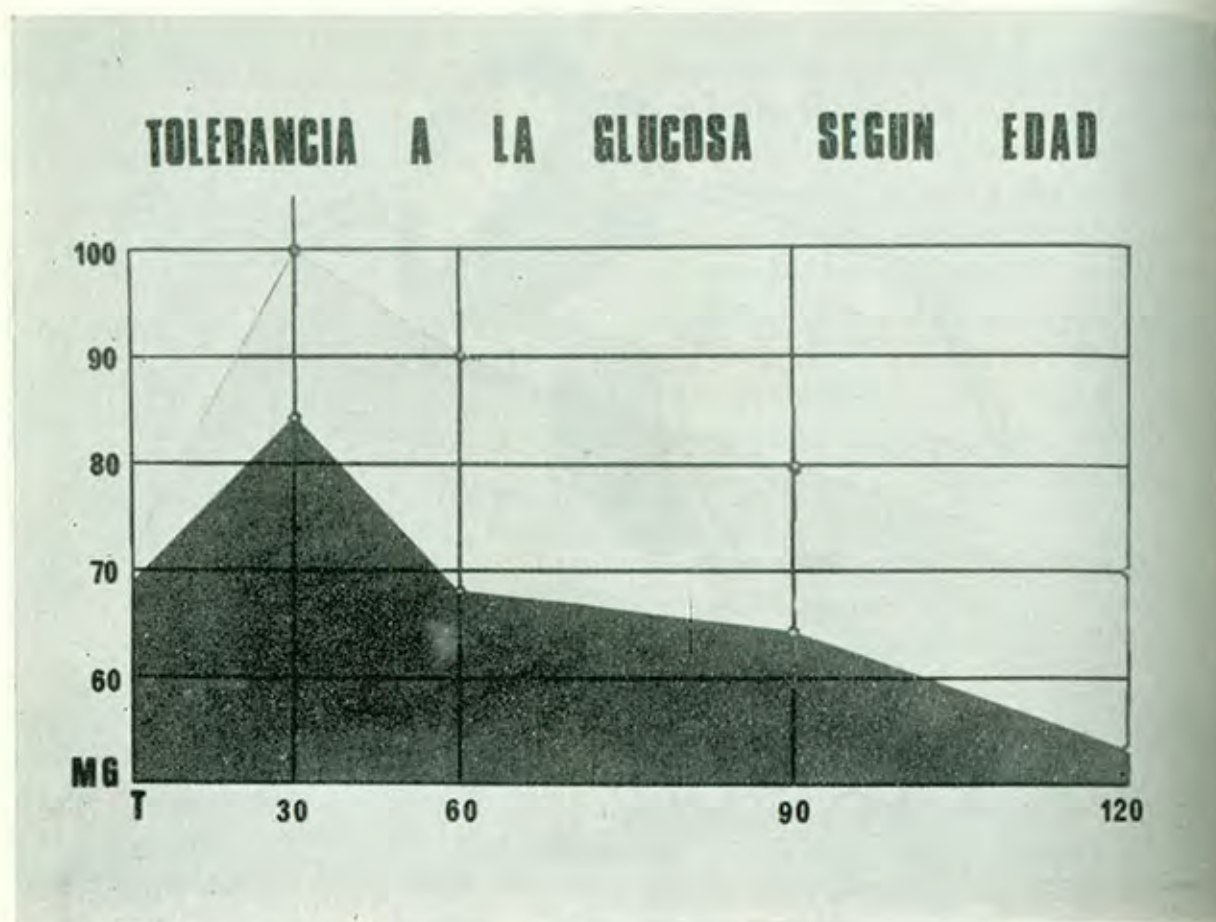


Fig. Nº 2

cemia obtenidos después de glucosa EV son mucho más elevados que aquellos producidos después de glucosa oral. Algo debía pues existir en el tubo digestivo que potencializaba el estímulo de la glucosa para liberar Insulina.

b) La descripción inicialmente por Dupré (3) y luego por Unger (4) de la existencia de sustancias hormonales en la pared duodenal capaces de estimular la liberación de Insulina.

c) La descripción por Sols y Col. (5) de una enzima hepática, la glucoquinasa, Insulino-dependiente, y según las palabras del autor "capacitada

para almacenar tanta glucosa cuanto podría llegar en exceso".

En base a estos hechos y nuestro razonamiento previo nos parecía imposible imaginar la siguiente hipótesis: En la figura No. 3 vemos lo que podría ser la secuencia de hechos desencadenados por la ingestión oral de glucosa.

La glucosa al llegar al Duodeno y durante el proceso de su absorción intestinal estimularía la liberación de las hormonas duodenales. Esta, por una vía que debe determinarse, estimulará la liberación de Insulina antes de que ninguna hiperglicemia es-

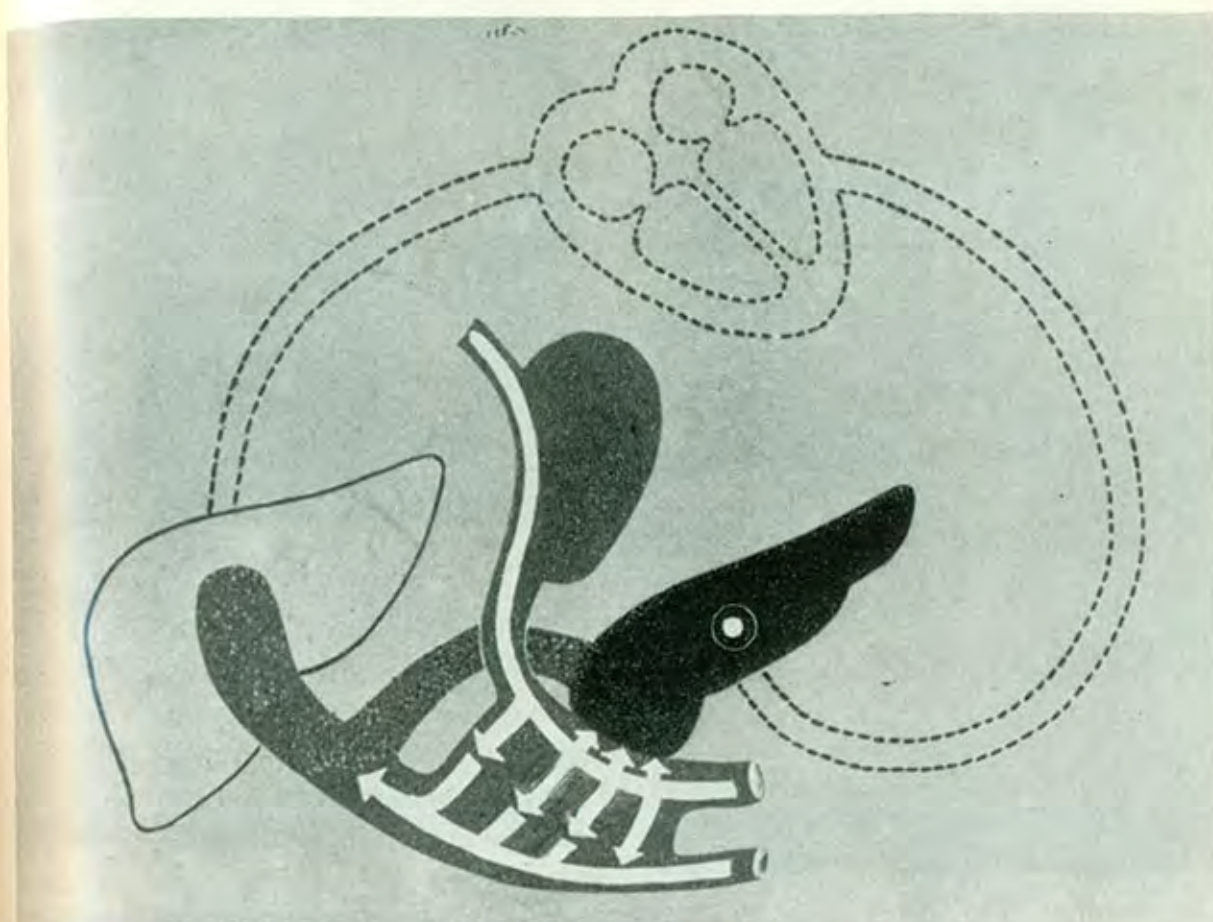


Fig. N° 3

tuviera presente en Vena Porta; al llegar al hígado estimularía la glucokinasa hepática, dejando a este órgano listo para almacenar la glucosa absorbida. Cualquier anomalía de este sistema, ya fuera a nivel del duodeno, ya fuera a nivel del páncreas en su reserva de Insulina conduciría a un escape hepático de la glucosa ingerida y por lo tanto a una hiperglicemia periférica.

En vista de comprobar estas hipótesis dos series de experimentos fueron comenzados simultáneamente destinados: La primera a estudiar qué sucedería a la glicemia post-glucosa en la ausencia de Duodeno, la segunda, a saber, cuáles son los tiempos

exactos de aumento de la glicemia y de la Insulinemia portal después de ingestión oral de glucosa en sujetos sin anestesia general.

No pudimos hallar en la literatura ningún dato preciso en lo que se refiere a nuestro segundo propósito. Dicho de otra manera no hay datos, o por lo menos no los había, que nos pudiesen precisar cuánto tiempo después de glucosa oral, aumentan en Vena Porta los niveles de glicemia o Insulina.

MATERIAL Y METODOS

Se pueden dividir estas experiencias en dos períodos:



Fig. N° 4

a) La verificación inicial de un hecho reportado muchas veces en el pasado, concerniente a la alteración tipo "diabético" en la curva standard de hiperglicemia provocada cuando la glucosa se sitúa directamente después del ángulo Duodeno-Yeyunal por intermedio de una intubación.

Para esta experiencia pedimos la colaboración a estudiantes de Medicina, a los cuales practicamos dos curvas de hiperglicemia con algunos días de intervalo, empleando la misma dosis de glucosa y la misma dilución; la primera vez por vía oral y la segunda por intubación post-Duodenal.

La posición de la sonda fue siempre verificada por rayos X (fig. 4) y la glucosa administrada lentamente.



Fig. N° 4-A

Para descartar el papel de un retardo en la llegada del azúcar al intestino que podría retardar su absorción, en cinco de estos mismos sujetos realizamos una tercera estimulación poniendo la extremidad de la sonda justo después del píloro.

b) La segunda serie de experiencias, comenzó casi simultáneamente, siendo mucho más difícil de realizar pero muy fecunda en cuanto a datos útiles, continúan hasta hoy.

Consiste esencialmente en obtener, sin anestesia general e inicialmente en sujetos normales, datos precisos sobre el momento en el cual comienza la hiperglicemia y la descarga de insulina provocada por la ingestión oral de glucosa.

Según la revisión bibliográfica realizada, hasta 1968 no existían cifras concernientes a estos dos hechos.

Para tales efectos empleamos la cateterización de la Vena Porta a través del vestigio de la Vena Umbilical



Fig. N° 5



Fig. N° 6

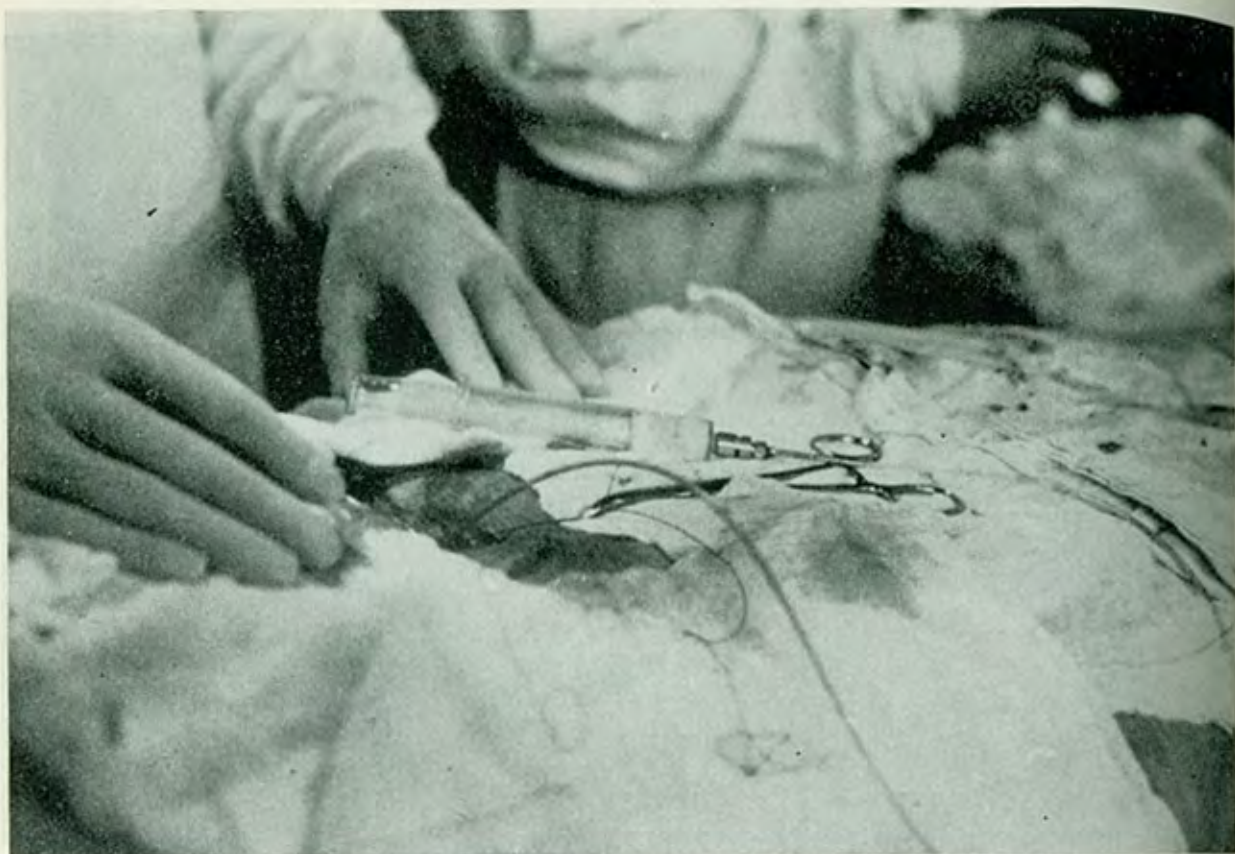


Fig. Nº 7

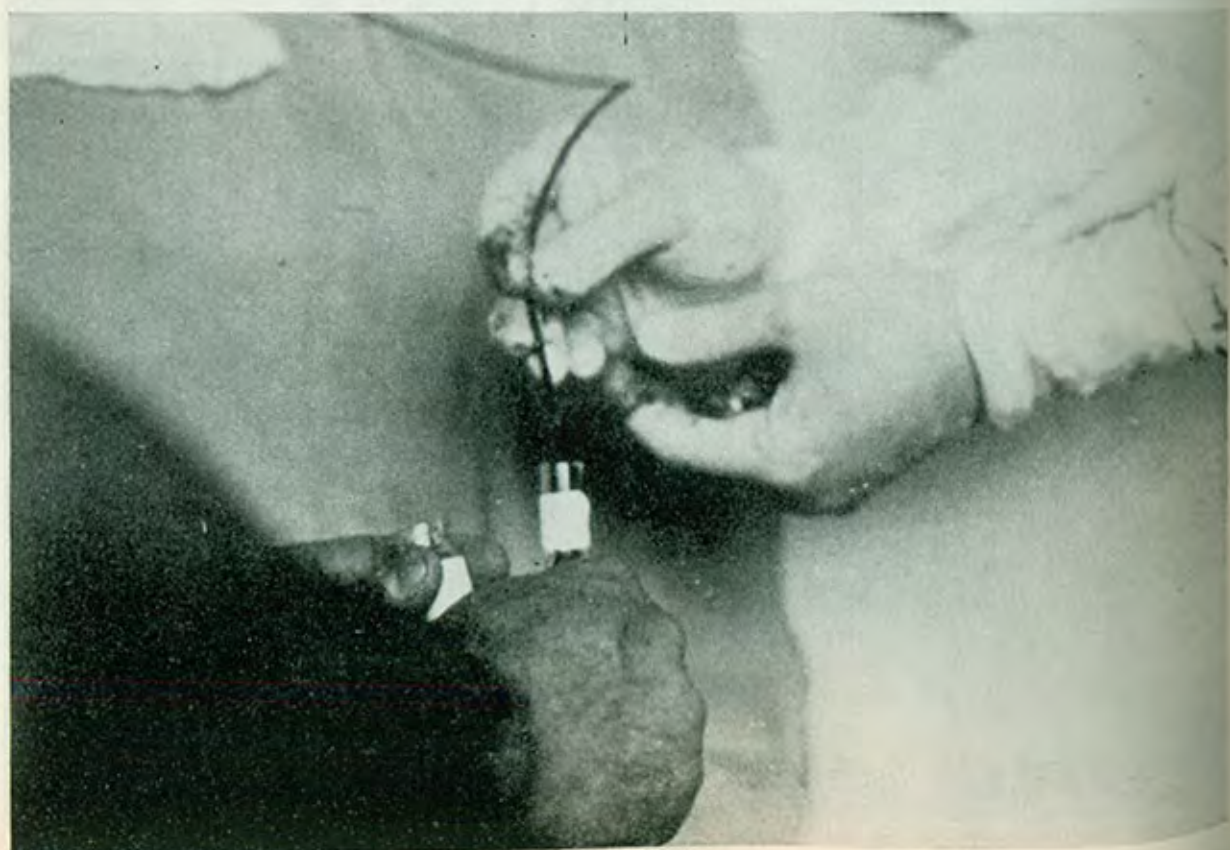


Fig. Nº 8

bajo anestesia local. (6) Las figuras 5 a 8 muestran diferentes etapas de esta pequeña cirugía. Para obtener la colaboración de los pacientes, escogimos aquellos que presentaban una hernia Umbilical; una vez realizada la cateterización y tomadas las muestras de sangre se practica la herniorrafia. El éxito de esta cateterización se consigue en aproximadamente un 50 p. 100 de los casos; los fracasos son causados por la fibrosis de la vena que impide su cateterización. Hemos hasta ahora realizado 45 de estas experiencias con 19 fracasos.

En práctica procedemos de la siguiente manera: de la consulta de Cirugía General escogemos los pacientes portadores de una hernia Umbilical. Practicamos una curva de hiperglicemia provocada y una colecistografía. Descartamos los sujetos de más de 45 años (en los cuales la cirugía fracasa más frecuentemente), aquellos que presentan cualquier sintomatología endocrina y los que presentan cualquier anomalía en su curva de glicemia. Estos últimos son empleados en otras series de experiencias destinadas a precisar los mismos fenómenos en los diabéticos.

Los sujetos seleccionados son hospitalizados el día anterior a la Cirugía. Con anestesia local, la vena Umbilical es disecada y se pasa un catéter hasta la Vena Porta. Después de tomar dos muestras de sangre a dos minutos de intervalo, para obtener los valores de ayunas, el sujeto bebe 100 gramos de glucosa disueltos en 240 ml. de agua. Muestras de sangre Por-

tal son tomadas cada minuto, después del comienzo de la ingestión de glucosa hasta el minuto 10, luego al minuto 15 y al minuto 30.

Las muestras de sangre periférica han sido obtenidas, en la mayor parte de los sujetos al tiempo cero, cinco, diez, quince y treinta minutos.

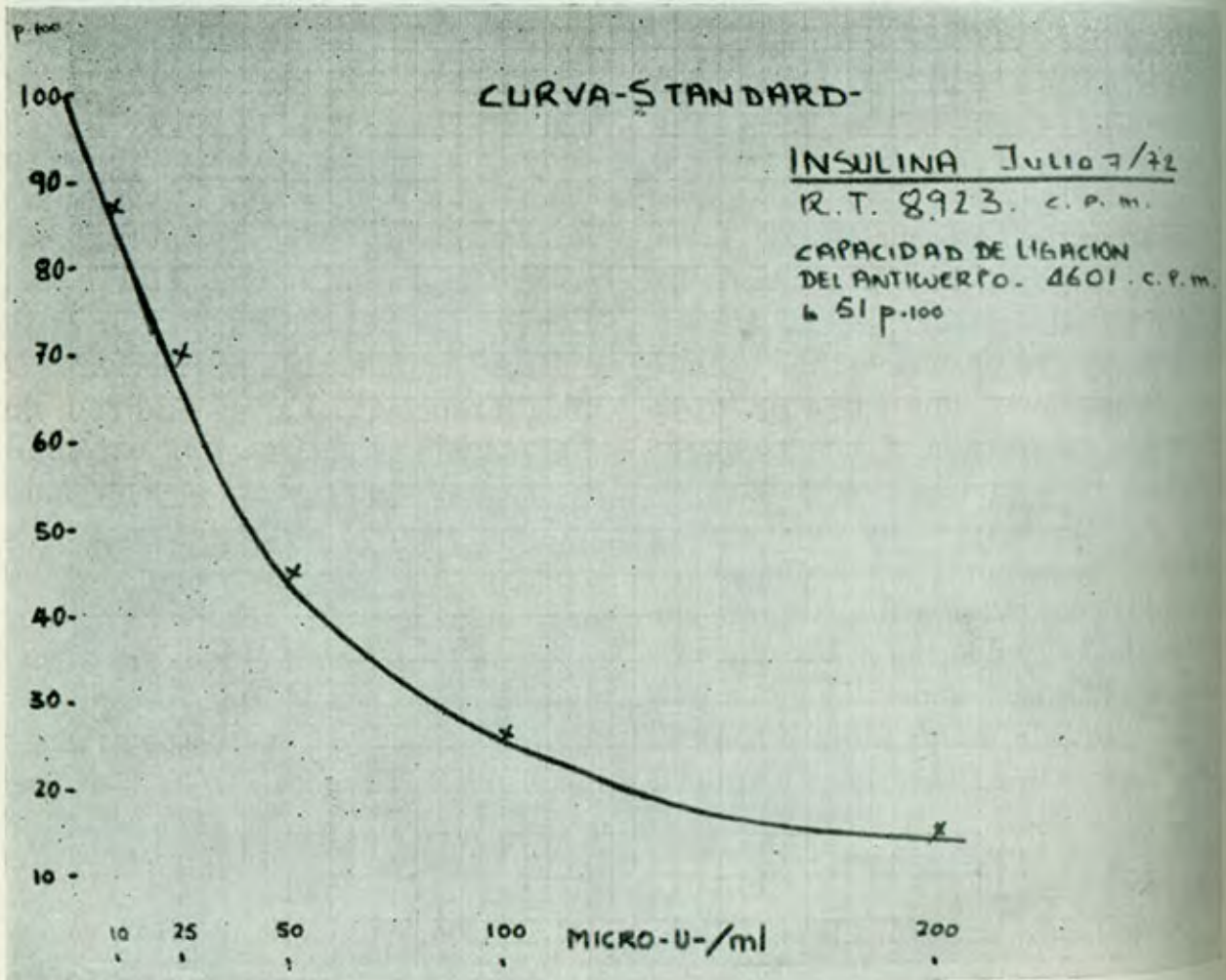
Las glicemias han sido determinadas, por duplicado, por la técnica de Somogyi-Nelson y la Insulinemia, en triplicado, por la dosificación Radioinmunoológica del doble anticuerpo (7). Técnica realizada por primera vez en nuestro país desde 1969 en nuestro laboratorio. Empleamos los "Kits" que para tal fin fabrica la —CEA— (Comisaría de Energía Atómica Francesa). La sensibilidad de éste método es enorme y la exactitud de los datos obtenidos es controlada durante todo el proceso. Todas las muestras desconocidas y standars son procesadas por triplicado. Los datos siguientes informan sobre la reproductividad de los standars empleados en la elaboración de la curva de referencia.

RESULTADOS

Las tablas números I y II muestran los resultados obtenidos en la primera serie de experiencias. La tabla I compara las glicemias después de la ingestión oral e intubación post-duodenal. En todos los casos existe una diferencia evidente con existencia de una hiperglicemia marcada cuando la glucosa fue depositada después del duodeno. Por el con-

RADIOINMUNO ANALISIS — INSULINA — Julio 7/72.
REPRODUCTIVIDAD DE LOS STANDARS

STS	Insulina Micro. U/ML.	1 Muestra	Duplicado	Triplicado	Promedio
St. 1	200	715	686	673	691
St. 2	100	1260	1374	1193	1276
St. 3	50	2155	1873	2171	2066
St. 4	25	3276	3145	3043	3155
St. 5	10	4275	3899	3819	3994



trario, como lo muestra la tabla II no hay prácticamente diferencia cuando el azúcar ha sido depositada en la zona post-pilórica.

Parece que el paso de la glucosa a través del duodeno juega un papel en

la respuesta pancreática (o hepática) a la ingestión de glucosa.

Los resultados de la segunda serie de experiencias pueden ser vistos en la tabla III y en las figuras 9, 10, 11 y 12.

TABLA 1

SONDA POST - DUODENAL

	A	10'	20'	30'	60'	120'	180'	
Caso 1	68	96	154	149	104	89	49	Oral
	92	74	164	221	184	61	68	Sonda
Caso 2	89	—	—	89	100	78	63	O
	89	115	141	141	115	85	92	S
Caso 3	70	—	—	100	71	64	53	O
	—	116	165	165	131	96	85	S
Caso 4	82	103	111	103	103	82	65	O
	88	124	145	145	174	57	54	S
Caso 5	74	78	88	116	103	82	65	O
	82	116	157	150	150	82	61	S
Promedios	76	92	118	111	96	79	63	O
	87	109	154	164	151	76	72	S

El estudio de las cifras de glicemia en Vena Porta nos muestra que el aumento de ésta no se produce sino 10 minutos después de la ingestión de glucosa oral, salvo en pocos casos en los cuales se han observado cifras elevadas desde el minuto 8.

Los promedios obtenidos en estos once casos son particularmente elocuentes.

Los valores de la Insulinemia pue-

den ser vistos en las figuras. El fenómeno esencial es el rápido aumento de la Insulinemia portal después de la ingestión oral de glucosa. En todos los casos estudiados se han observado valores elevados desde el segundo minuto; este aumento persiste en general hasta el cuarto minuto, y es seguido de una caída progresiva. Un nuevo pico comienza hacia el minuto 10 y los valores se mantienen elevados hasta el minuto 30 (última muestra). La res-

TABLA 2
SONDA POST — PILORICA

	A	10'	20'	30'	60'	120'	
Caso 1	65	85	107	118	93	86	Oral Sonda
	81	115	141	108	100	85	
Caso 2	82	111	104	104	131	65	S†
Caso 3	72	—	—	93	63	59	O
	78	100	92	82	78	59	S
Caso 4	84	125	138	108	100	—	S†
Promedios	82	110	116	100	101	70	O
	68	85	107	105	78	72	S

† No se practicó Cura Oral.

puesta pancreática a la glucosa oral, juzgada por las cifras de Insulinemia portal es bifásica, con un pico inicial muy precoz de corta duración y un segundo pico que parece prolongarse por lo menos hasta el minuto 30.

DISCUSION

La posibilidad de determinar los niveles de Insulinemia, inicialmente por técnicas biológicas (7,8,9) y luego por los métodos Radio-inmunológicos (10,11,12) aportan nuevas bases para la comprensión, no solamente de

la fisio-patología de la Diabetes, sino también en general de todo lo concerniente al metabolismo intermediario. Podemos, sin exagerar, afirmar que las dosificaciones Radio-inmunológicas han modificado la mayor parte de los conceptos fisiológicos. Sin embargo, en lo que concierne a la insulina, todas las experiencias humanas y los conocimientos que de ella se derivan tienen como base la medida de valores de Insulinemia en sangre periférica. Es decir aquellos de la secreción pancreática modificada al paso por

TABLA 3

GLICEMIA PORTAL DESPUES DE GLUCOSA ORAL

CASOS	0	2	4	6	8	10	15	30 MINUTOS
1	74	88	81	74	78	81	96	96
2	89	100	104	89	111	104	127	140
3	92	100	103	92	107	103	115	136
4	92	100	96	115	96	128	128	150
5	88	57	77	81	92	92	108	161
6	82	93	96	93	96	107	152	144
7	89	86	89	93	123	143	135	126
8	96	89	89	89	92	89	100	116
9	—	82	75	75	79	75	97	123
10	—	—	—	68	51	96	115	128
11	78	78	81	89	108	133	171	193
PROMEDIO	86	87	89	87	93	104	122	137

GLICEMIA INSULINA
mg p100 Micro U/ml.

CASO N° 13 R.M.G.

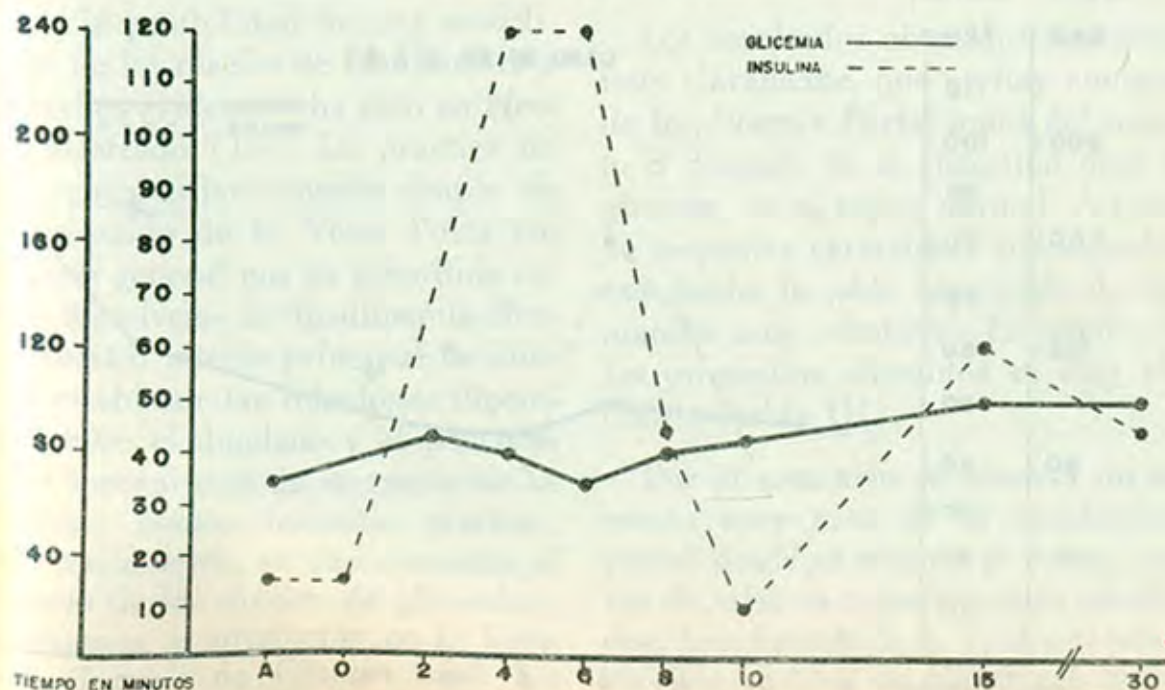


Fig. No. 9

GLICEMIA **INSULINA**
mg p100 Micro U.ml.

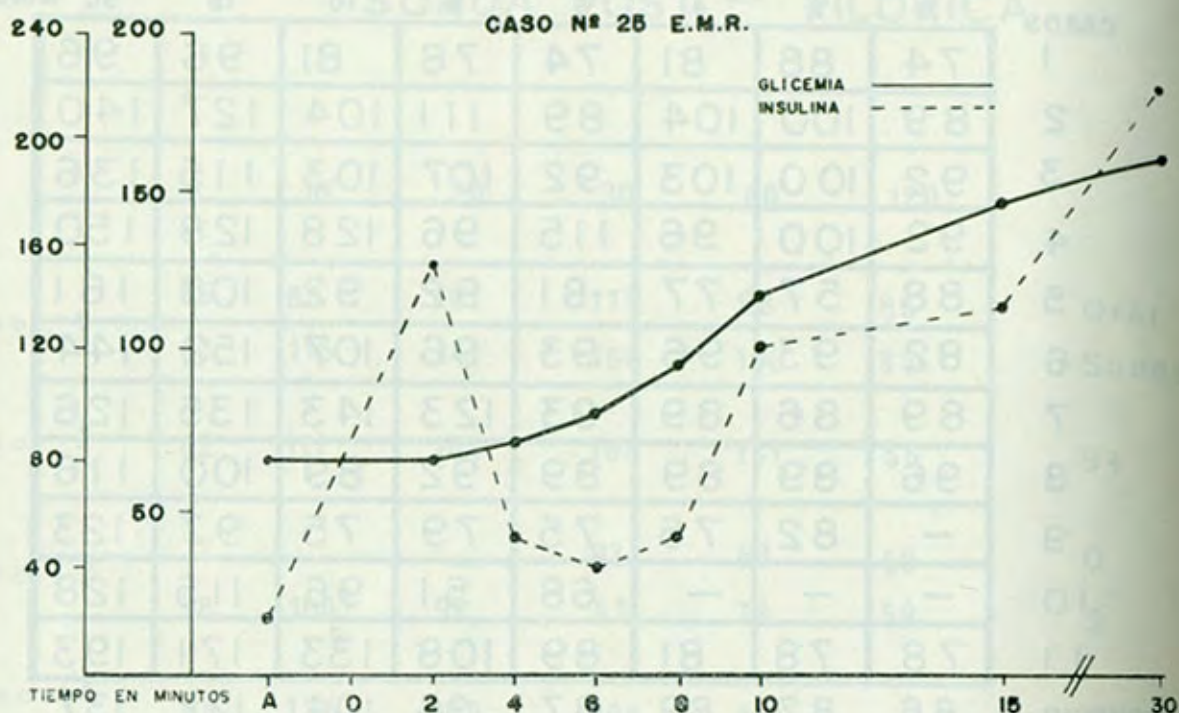


Fig. N° 10

GLICEMIA **INSULINA**
mg p100 Micro U.ml.

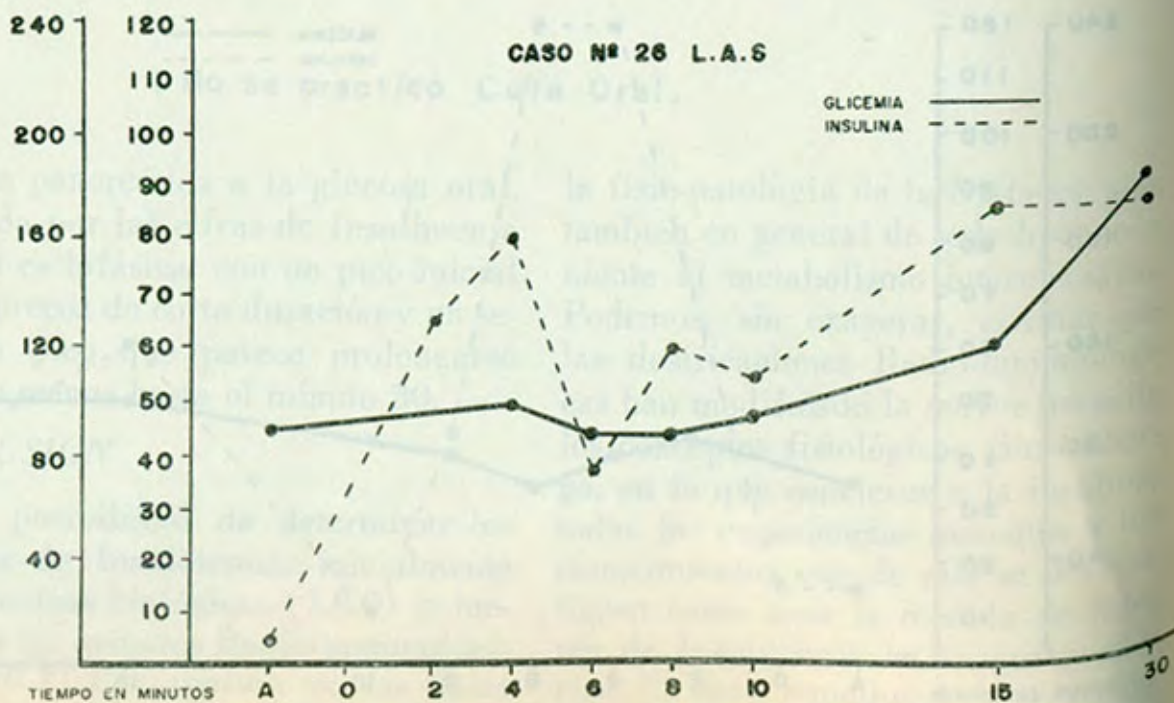


Fig. N° 11

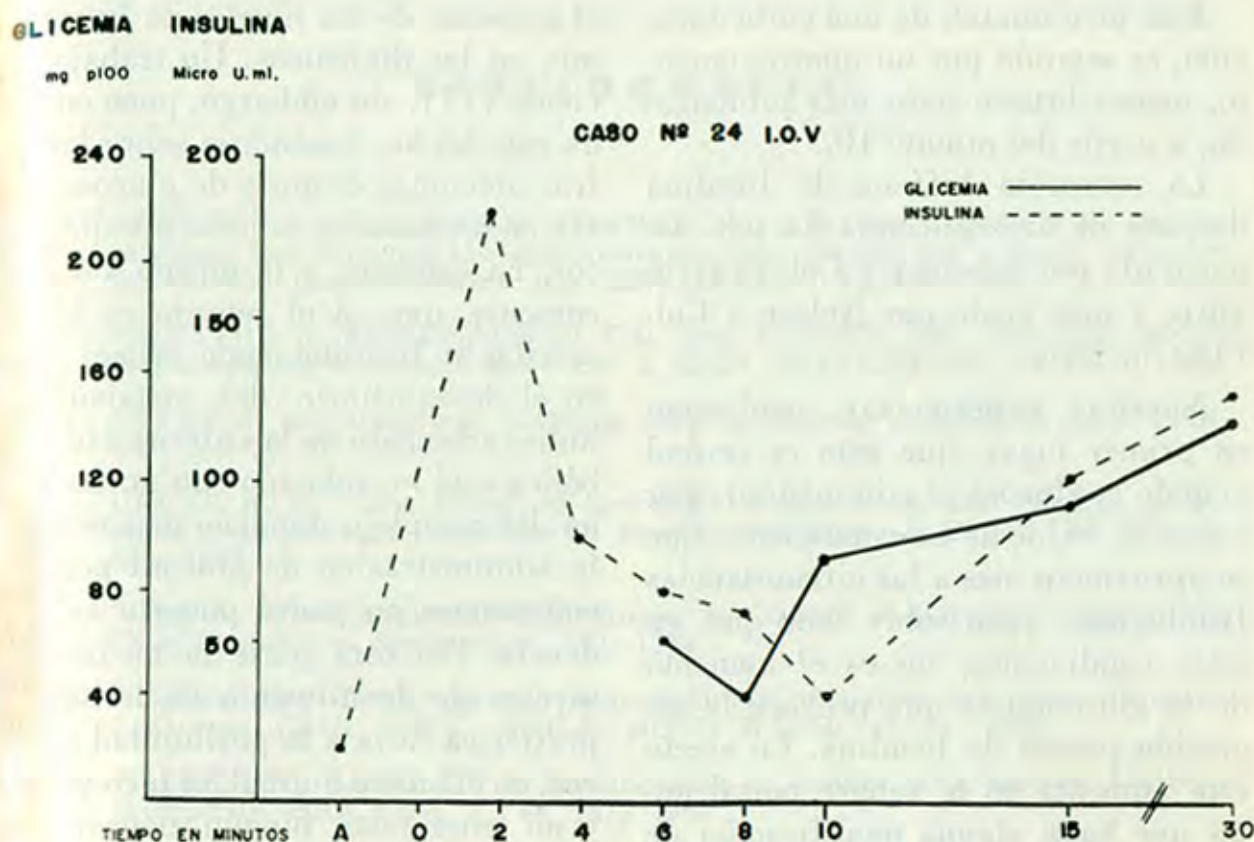


Fig. Nº 12

el hígado. Siendo el hígado uno de los órganos "blanco" esenciales de la Insulina, la posibilidad de una modificación de los niveles de Insulinemia a su nivel es evidente y ha sido en efecto demostrado (13). La práctica de una técnica relativamente simple de cateterización de la Vena Porta sin anestesia general nos ha permitido conocer los niveles de Insulinemia Portal. Nuestro interés principal ha sido el de establecer las relaciones funcionales entre el duodeno y el páncreas en los mecanismos de secreción de la Insulina; hemos buscado precisar, muy exactamente, en qué momento el aumento de los niveles de glicemia e Insulinemia se producían en la Vena Porta después de Glucosa oral. No conocíamos, a pesar de la revisión bi-

bliográfica efectuada hasta 1968, cifras concernientes a estos fenómenos.

Los resultados obtenidos muestran, muy claramente, que no hay aumento de la glicemia Portal antes del minuto 8 después de la ingestión oral de glucosa, en el sujeto normal. A pesar de pequeñas variaciones individuales, este hecho ha sido observado de una manera muy constante. El estudio de los promedios obtenidos es muy elocuente (tabla III).

Por el contrario se observa un aumento muy neto de la Insulinemia portal desde el minuto 2 y esto, una vez de más, en todos los casos estudiados. Las figuras 5, 6, 7, 8 y 9 muestran los perfiles de glicemia e Insulinemia obtenidos en estos sujetos.

Este pico inicial, de una corta duración, es seguido por un nuevo aumento, menos brusco pero más prolongado, a partir del minuto 10.

La secreción bifásica de Insulina después de hiperglicemia ha sido demostrada por Grodsky y Col. (14) *in vitro*, y más tarde por Nelson y Col. (15) *in vivo*.

Nuestras experiencias, confirman en primer lugar, que esto es verdad cuando la glucosa es administrada por vía oral, es decir en condiciones que se aproximan más a las circunstancias fisiológicas; pero sobre todo que, en estas condiciones, no es el aumento de la glucemia la que provoca la secreción precoz de Insulina. En efecto ésta aumenta en la sangre portal antes que haya alguna modificación de la tasa de glucosa portal.

Todo ésto nos ha llevado a deducir que la ingestión de glucosa desencadena, a nivel del duodeno, la liberación de sustancias u hormonas capaces de estimular la secreción de Insulina.

Lazarus y Col. (16) han demostrado que los niveles de Secretina aumentan en el plasma antes que la glicemia, después de la ingestión oral de glucosa. Parece pues que un exceso de Insulina debe llegar a la célula hepática antes que la ola de hiperglicemia y desencadenar la síntesis de Glucokinasa (7). En su ausencia la síntesis de glicógeno se vería trabada y el sujeto presentaría una hiperglicemia precoz.

Numerosos trabajos, después de la publicación inicial de Berson (10), han puesto en evidencia un retardo en

el aumento de los niveles de Insulinemia en los diabéticos. Un trabajo reciente (17), sin embargo, pone en duda este hecho, basándose sobre las cifras obtenidas después de glucosa por vía endovenosa en sujetos pre-diabéticos. Es evidente, y el mismo autor lo comenta, que, si el retardo en la secreción de Insulina como primer paso en el desequilibrio del metabolismo hidrocarbonado de la enfermedad diabética está en relación con un trastorno del complejo duodeno-pancreático, la administración de glucosa por vía endovenosa no podrá ponerlo en evidencia. Por otra parte la medida de niveles de Insulinemia en la sangre periférica lleva a la posibilidad de no ver, en el sujeto normal, el pico precoz y no tener pues, ningún elemento de comparación.

Si nosotros postulamos un problema de tiempo de secreción en la génesis de hiperglicemia diabética, nos referimos a la desaparición (o tal vez disminución) del pico precoz, ese que nosotros observamos en la sangre portal y no a un retardo apreciable por medio de medidas hechas en sangre periférica, cada media hora después de glucosa oral.

Si esto es así, es necesario continuar los estudios de la secreción de hormonas duodenales y precisar sus relaciones con las diferentes clases de alimentos y persistir en la medida de la Insulinemia portal bajo diferentes circunstancias experimentales, puesto que es posible que estemos muy cerca de precisar uno de los pasos esenciales en la fisiopatología de la diabetes.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ARNOULD Y., BELLENS R., FRANKSON J.R.M. and CONARD V. Insulin response and Glucose c14 disappearance rate during the glucose tolerance test in the unanesthetized dog. *METABOLISM* 12,1122. 1963.
- 2 — McINTYRE N., HOLDSWORTH C.D. and TURNER D.S. Intestinal factors in the control of Insulin secretion. *J. CLIN. ENDOCRINOL.* 24. 1317. 1965.
- 3 — DUPRE J. and intestinal hormone affectin glucose disposal in man. *LANCET* Vol II, 672, 1964.
- 4 — UNGER R. H. - The effects of Secretin, Pancreozymin, and Gastrin on Insulin and Glucagon secretion in anesthetized dogs. *J. CLIN. INVEST.* 46. 630. 1967.
- 5 — SOLS A. Hexokinase and Glucokinase. in Control of Glycogen Metabolism. Ciba Foundation Symposium. 301. 1964.
- 6 — GONZALES O.C. Portography, a preliminary of a new technique via umbilical vein. *CLIN. PROC. CHILD. HOSP. WASH.* 15,120. 1959.
- 7 — HALES C.N., RANDLE P.J. Immunoassay of Insulin with Insulin Antibody precipitate. *BIOCHEM. J.*, 88, 137) 1963.
- 8 — BEIGELMAN P.M. Bio-assay for Insulin-like-activity utilizing glucose uptake by adipose tissue. *METABOLISM.* 9, 580. 1960.
- 9 — POWER L., REYES—LEAL B. and CONN J.W. Serum Insulin-like-activity in genetic and experimental Diabetes Mellitus. *METABOLISM.* No. 13,1297, 1964.
- 10 — YALOW R.S. and BERSON S.A. Immunoassay of endogenous plasma Insulin in man. *J. CIN. INVEST.* 39,1157, 1960.
- 11 — GRODSKY G.M. and FORSHAM P.H. and immunochemical assay of total extractable Insulin in man. *J. CLIN. INVEST.* 36,1070, 1960.
- 12 — MORGAN C.R. and LAZAROW A. Immunoassay of Insulin using capture and degradation of Insulin 1131 by the cyclically perfused rat liver. *ANN. N. Y. ACAD. SCI.* 82/2,329, 1959.
- 13 — MORTIMER G.E. and TIETZE F. Studies on the mechanism of capture and degradation of Insulin 1131 by the cyclically perfused rat liver. *ANN. N.Y. ACAD. SCI.* 82/2, 329, 1959.
- 14 — CURRY D.L. BENNETT L.L. and GRODSKY G.M. Dynamics of Insulin secretion by the perfused rat pancreas. *ENDOCRINOLOGY* 83, 572, 1968.
- 15 — BLACKARD W.G. AND NELSON N.C. Portal and peripheral vein immunoreactive Insulin concentration before and after glucose infusion. *DIABETES* 19, 302, 1970.
- 16 — CRISHOLM D.J., YOUNG J.D. and LAZARUS L. the gastrointestinal stimulus to Insulin release. I Secretin. *J. CLIN. INVEST.* 48,1453, 1969.
- 17 — REAVEN G.M., SHEN S.W., SILVERS A. and FARQUHAR J.W. Is there a delay in the plasma Insulin of patients with chemical Diabetes Mellitus. *DIABETES* 20,416, 1971.