

Diabetes Mellitus

BASES EXPERIMENTALES DE NUEVOS CONCEPTOS ETIOLOGICOS

Dr. BERNARDO REYES LEAL

Centro de investigaciones (Unidad de Endocrinología), Facultad de Medicina,
Universidad Nacional. Bogotá - Colombia

Los trabajos clínicos y experimentales sobre la Diabetes Mellitus hasta comienzos del presente siglo tuvieron su culminación en la producción de hiperglicemia por pancreatometomía, por Von Mering y Minkowsky (1), y el aislamiento de la Insulina por Banting y Best (2). Todo hacía pensar que la enfermedad humana que nos ocupa era el resultado de una lesión de las células beta del Páncreas y el consiguiente déficit, parcial o total, de Insulina. Anotemos, sin embargo, que hacia 1860 Claude Bernard sostenía un origen hepático de la hiperglicemia (3).

Muchos recuentos históricos existen sobre la evolución de las ideas hasta 1922. Algunos de ellos son excelentes y sería superfluo, y fuera de lugar, ocuparnos de ello. Nuestro propósito es solamente revisar lo sucedido desde hace aproximadamente

17 años.

Creemos, en efecto, que fueron BORNSTEIN y sus colaboradores (4) en el laboratorio de Lawrence en Londres, quienes por primera vez reportaron la existencia de niveles de Insulina en plasma, más altos en los pacientes diabéticos que en los sujetos normales. Usando ratones hipofiso-adrenalectomizados y en los cuales los islotes de Langerhans habían sido destruidos por Aloxano, llegaron a reportar cifras de Insulinemia muy cercanas a las halladas actualmente. (100 microunidades por ml. en normales, y 300 microunidades por ml. en los diabéticos).

Estos datos, en plena contradicción con las ideas establecidas, estimularon extraordinariamente la investigación. Fue necesario pensar en establecer técnicas más exactas, y sobretodo más prácticas para determinar la Insulina en el plasma.

DOSIFICACION DE LA INSULINA EN PLASMA

Las técnicas actuales no dosifican la Insulina per se, sino el resultado de su presencia, ya sea sobre un sis-

tema biológico, ya sea sobre uno inmunológico.

—Las primeras usan como pará-

metro de la cantidad de Insulina presente, el paso de glucosa del medio de incubación a un tejido aislado.

—Las segundas aprecian la cantidad presente por su fijación sobre un anticuerpo previamente estandarizado.

Si un tejido, músculo o tejido graso, es incubado dentro de un medio que contiene glucosa, el paso de tal glucosa al tejido es función de la cantidad de Insulina presente. A pesar de haberse descrito diferentes artefactos, no se conoce ninguna sustancia fuera de la Insulina que, en las cantidades normalmente presentes en el plasma, produzcan tal efecto.

Por primera vez, en 1941, Gemmill (5) reportó que la Insulina aumentaba la síntesis de glicógeno por el diafragma aislado de rata. A partir de esto, Groen en 1952 (6), Randle en 1954 (7) y Vallance-Owen en 1957 (8) describieron técnicas detalladas de la dosificación de la actividad "insulinoide" (ILA) del plasma.

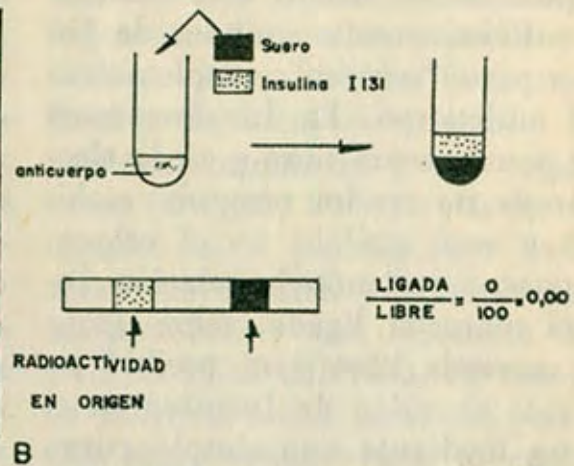
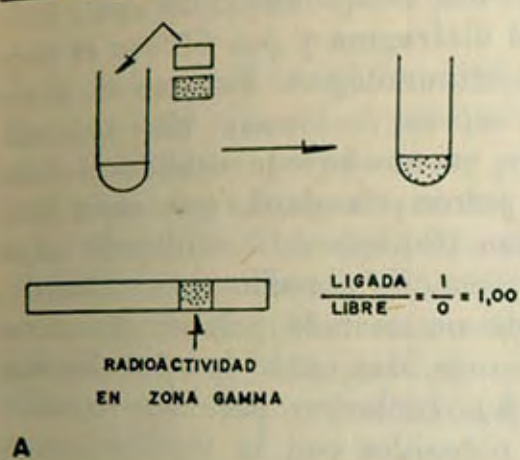
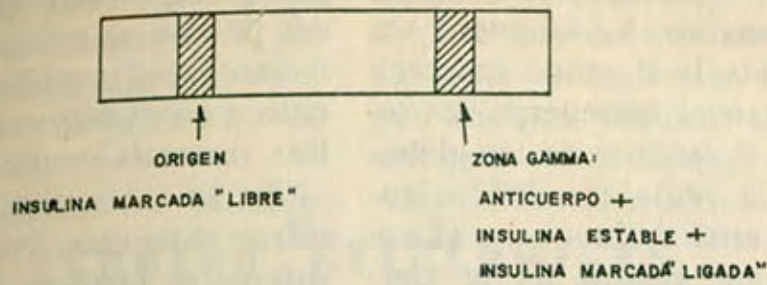
Martin, en 1958 (9) fue el primero en usar el tejido graso del epididimo de rata. Más tarde, en compañía de Renold y otros colaboradores (10) describió la técnica detallada usando tal tejido. Como pa-

rámetro del paso de glucosa al tejido se puede usar ya sea el desprendimiento de CO_2 , ya sea la síntesis de lípidos.

A la glucosa estable usada inicialmente se agrega actualmente pequeñas cantidades de Glucosa marcada con Carbono 14, lo que simplifica considerablemente tales técnicas.

Varias técnicas usando las propiedades inmunológicas de la Insulina han sido descritas (11); las únicas usadas actualmente derivan de la inicialmente descrita por Yalow y Berson en 1960 (12). Esta técnica emplea un principio muy ingenioso, que hace de ella el método ideal hoy, para la dosificación inmunológica de las hormonas de naturaleza proteica. Ya ha sido usada ampliamente para la medida de la hormona de crecimiento; se basa en la competencia que se establece entre la Insulina estable del plasma (que es lo que se quiere medir) e Insulina radioactiva (o mejor marcada) agregada en cantidades conocidas, por un anticuerpo previamente estandarizado. El anticuerpo fija inicialmente la Insulina estable y luego la Insulina marcada. Así pues tanta más Insulina marcada quedará libre (es decir no prendida al anticuerpo), cuanto más Insulina estable haya en el plasma. (Fig. 1).

FIG. 1



CASOS EXTREMOS :

- A) Suero sin insulina estable
- B) Suero con grandes cantidades de insulina estable.

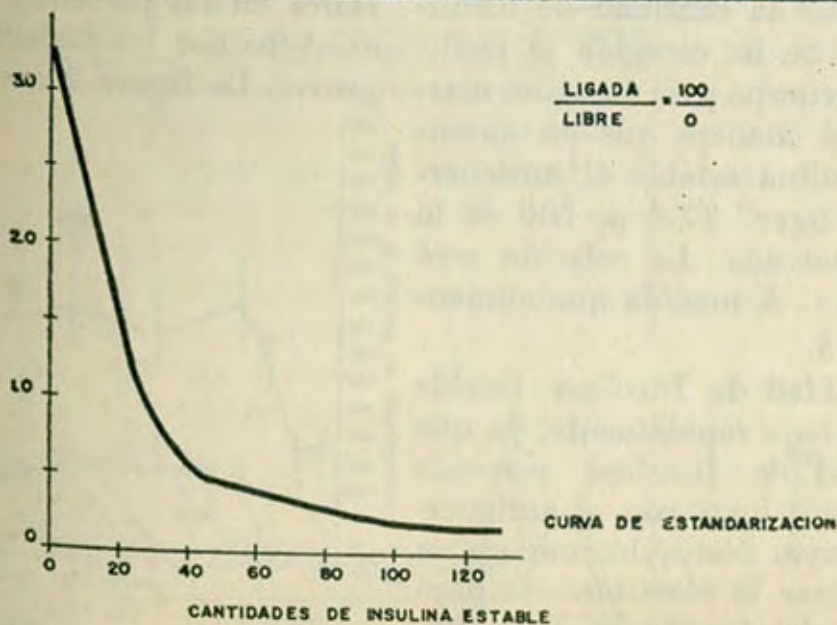
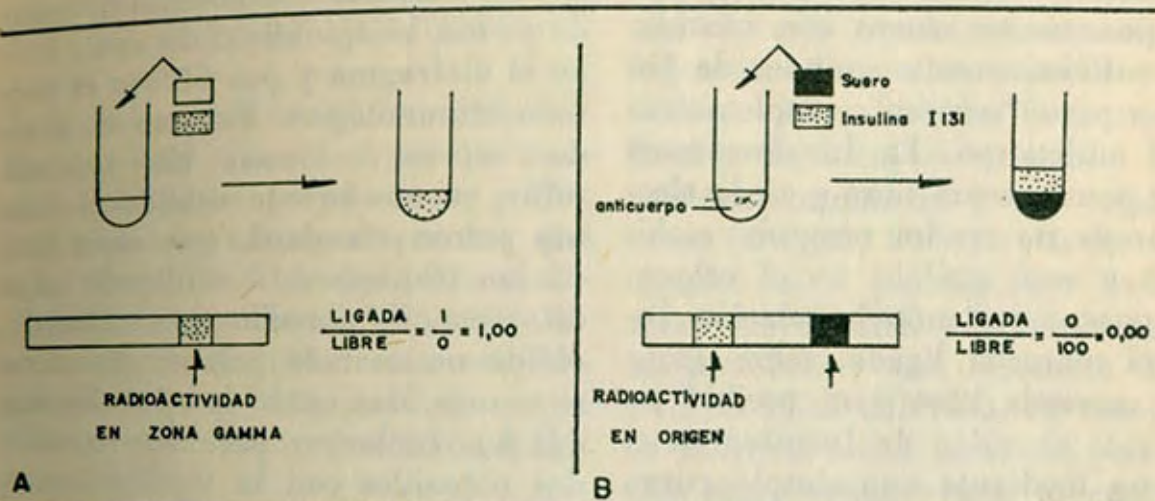
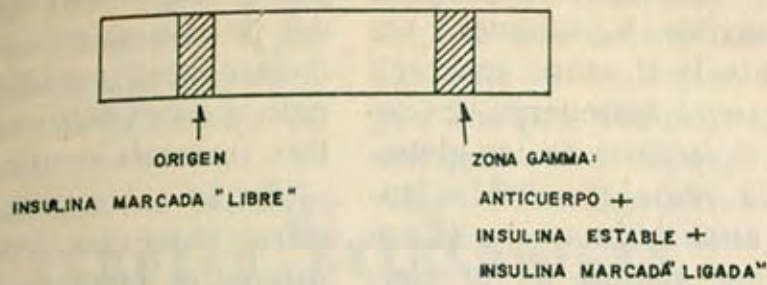
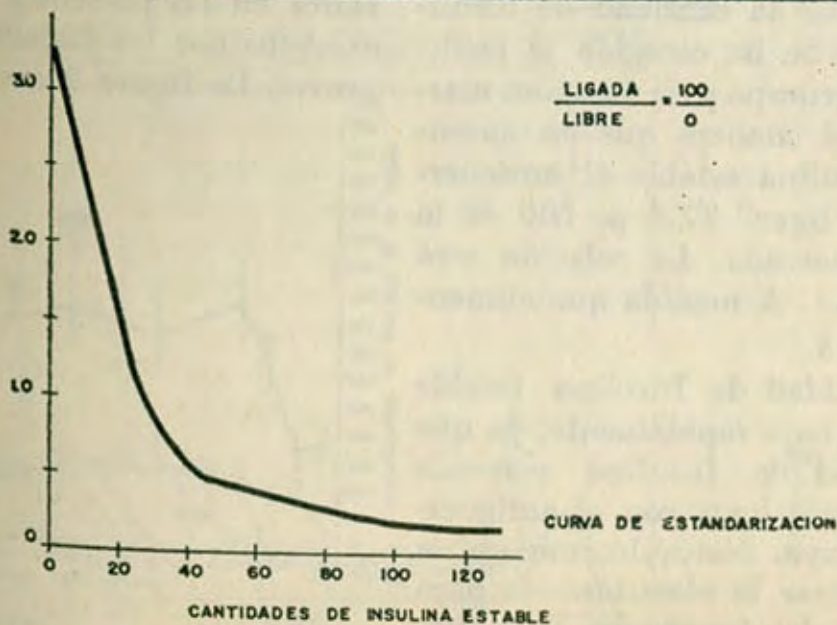


FIG. 1



CASOS EXTREMOS :

- A) Suero sin insulina estable
 B) Suero con grandes cantidades de insulina estable.



En la figura mostramos dos ejemplos extremos: en A, un suero sin Insulina. Toda la Insulina marcada será fijada por el anticuerpo. Si separamos las albúminas de las globulinas, toda la radioactividad se encontrará en estas últimas con el anticuerpo (zona gamma de la electroforesis). Por el contrario, en B imaginamos un suero con cantidades suficientemente grandes de Insulina para "saturar" completamente el anticuerpo. La Insulina marcada permanecerá libre y en la electroforesis no tendrá ninguna movilidad y será medida en el origen. Así pues conociendo la relación Insulina marcada ligada, sobre Insulina marcada libre será posible conocer la cantidad de Insulina en el plasma mediante una simple curva de estandarización. En la figura damos un ejemplo de tal curva. En las abscisas está representada la relación: *Insulina marcada Ligada*, en

Insulina marcada Libre

las ordenadas la cantidad de insulina estable. Se ha escogido la cantidad de anticuerpo y de Insulina marcada de tal manera que en ausencia de Insulina estable el anticuerpo pueda "ligar" 77.5 p. 100 de la Insulina marcada. La relación será igual a $\frac{77.5}{22.5}$. A medida que aumen-

ta la cantidad de Insulina estable la relación baja rápidamente, ya que la cantidad de Insulina marcada que se puede ligar con el anticuerpo disminuye. Naturalmente no es necesario usar la electroforesis para separar las dos fracciones. Una sim-

ple precipitación de las globulinas del plasma es suficiente; la radioactividad será medida en el precipitado y en el sobrenadante. La Insulina marcada contiene I 131.

En la tabla 1 se pueden ver las cifras obtenidas, en ayunas por las diferentes técnicas. Como se puede ver las mayores son obtenidas cuando se usa el epididimo de rata, luego el diafragma y por último el método inmunológico. Esto no es debido a errores de técnica. Hay que admitir, ya que se está usando el mismo patrón standard, que cada una de las técnicas está midiendo algo diferente. Es por ello que se ha decidido no usar la palabra Insulina sino más bien actividad insulinoide (ILA). Inclusive para los resultados obtenidos con la técnica inmunológica sería preferible usar la expresión "insulina inmunológicamente reconocible".

Cualquiera que sea la técnica que se use, se han hallado valores superiores en los pacientes diabéticos, si exceptuamos los diabéticos juveniles graves. La figura 2 nos da un ejem-

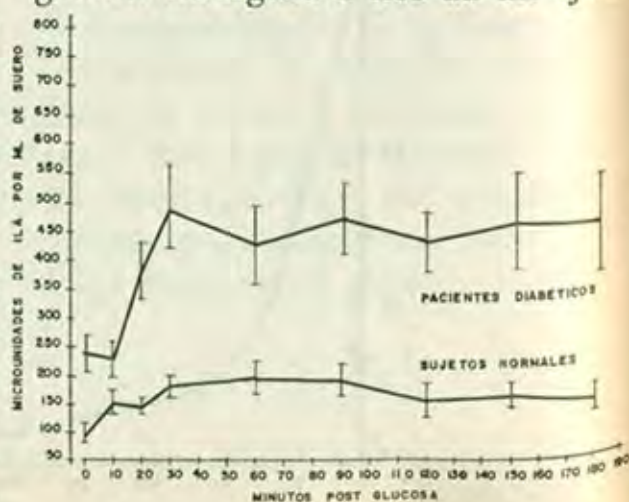


FIG. 2

plo de las curvas de Insulinemia durante test de tolerancia a la glucosa en sujetos normales y pacientes diabéticos, usando la técnica del epididimo de rata.

Todo esto confirma los hallazgos

iniciales de Bornstein, y nos plantea el problema de explicar la aparente paradoja de hallar en el mismo sujeto Diabetes Mellitus (es decir, entre otras cosas, hiperglicemia) y niveles de Insulina altos.

TEORIAS ETIOLOGICAS

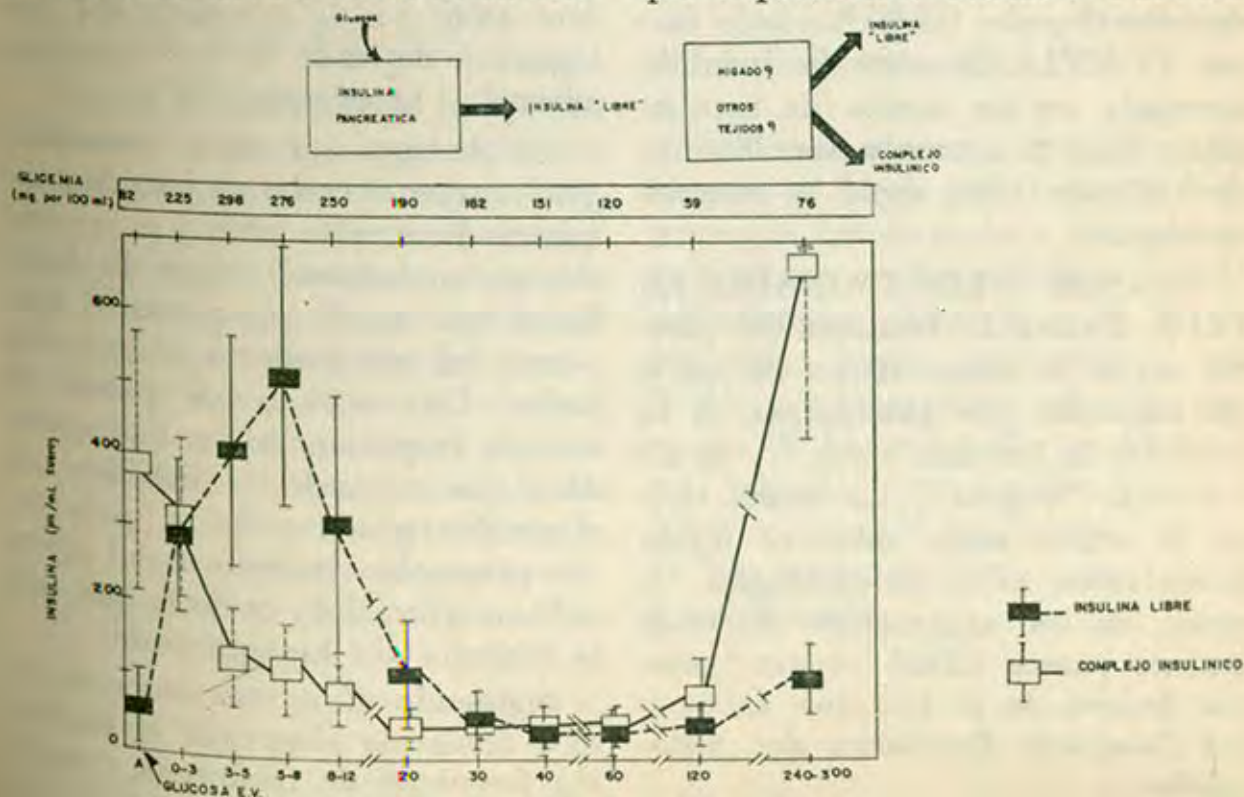
A) INSULINA LIBRE Y COMPLEJO INSULINICO

Como anotábamos, las cifras de Insulinemia obtenidas por los métodos biológicos (tejido graso y diafragma) son mayores que las que suministran las técnicas inmunológicas. Esto nos lleva a la noción clara de que la Insulina existe en plasma por lo menos bajo dos formas que difieren por sus características inmunológicas.

A partir de este concepto, dos escuelas, la de ANTONIADES en Bos-

ton y la de FRASER en Londres, han llevado a cabo numerosos trabajos experimentales tratando de establecer la naturaleza de estas dos formas de Insulina.

Para Antoniades y sus colaboradores (17, 18, 19 y 20) la Insulina circula en el plasma bajo dos formas: una LIBRE y la otra ligada a las proteínas y que denomina COMPLEJO INSULINICO. El complejo es inactivo sobre músculo pero activo sobre tejido graso, el cual poseería un sistema enzimático (ATE) que le permitiría utilizarlo. Para ser



activo sobre músculo el complejo debe pues ser previamente transformado en Insulina Libre. Toda fuerza que tienda a estimular tal transformación será hipoglicemiante y viceversa. (ver figura 3). El Páncreas secreta la Insulina bajo forma libre, pero ésta es rápidamente convertida en complejo ya sea por el hígado, ya sea por los tejidos periféricos. La dinámica de estas dos formas de Insulina durante un test de Tolerancia a la Glucosa puede verse en la figura. La Insulina *Libre* aumenta rápidamente, al mismo tiempo que el complejo cae. La Insulina medida en ayunas está representada casi exclusivamente por *complejo Insulínico*. Los autores han descrito un método experimental que les permite determinar las dos formas de Insulina en plasma.

Más recientemente Antoniades ha descrito el poder inhibidor de la forma COMPLEJO sobre la Insulina agregada en un medio de incubación. Esto lo acerca a las Teorías de Vallance-Owen como lo veremos en seguida.

FRASER Y COLABORADORES (21), dividen la Insulina del plasma según la característica de ser o no inhibidas por anticuerpos. A la inhibible la llaman "típica" y la no inhibible "atípica". La forma típica es activa tanto sobre el tejido graso como sobre el diafragma. A pesar de los argumentos de estos autores parece difícil separar estas dos formas de la Insulina *Libre* y del *Complejo Insulínico* de Antoniades.

B) ANTAGONISTAS

Siguiendo un camino diferente, Vallance-Owen y colaboradores (22) han descrito la existencia en el plasma de los diabéticos de una sustancia antagonista de la Insulina. Tal sustancia migra electroforéticamente con las albúminas y por ello se le denomina Sinalbúmina. Vallance-Owen parte de las siguientes bases: en el plasma de los sujetos diabéticos no insulino-dependientes es posible medir actividad Insulínica. Por el contrario para detectar tal actividad en el suero de los diabéticos insulino-dependientes es necesario agregar cierta cantidad de Insulina. Todo sucede como si hubiese sido necesario superar la presencia de algo que se oponía a la actividad de la Insulina agregada. A ese algo se le llamó Antagonista. Más tarde encontraron que la presencia del Antagonista depende de las funciones adrenal e hipofisaria (23).

El Antagonista sería transmitido genéticamente como un carácter autosomo-dominante (24) y se encuentra en un número mayor de familiares que aquél que presenta trastornos del metabolismo hidro-carbonado. Esta noción nos parece de enorme importancia, ya que quiere decir que se puede ser diabético (en el sentido genético de la palabra) sin presentar trastornos del metabolismo glucídico: es decir que existe Diabetes sin hiperglicemia.

Siguiendo el mismo razonamiento y habiendo observado la existencia frecuente de trastornos vascula-

res en pacientes con familia diabética pero sin hiperglicemia, decidieron seleccionar un grupo de 28 pacientes con trastornos coronarios sin tener en cuenta la existencia o no de familia diabética y compararlo con un grupo control, sin trastornos vasculares. Es interesante que en el primer grupo, 19 presentaban el Antagonista, mientras que en el segundo solamente 9.

El interés de estos hallazgos es considerable, ya que nos permite considerar el Antagonista como el primer "marcador" genético de la enfermedad Diabetes Mellitus. Mas recientemente, basados en la semejanza de los pesos moleculares y el poder antagonista de la cadena B de la Insulina, han sugerido la posibilidad que estas dos sustancias no sean sino una sola.

C) CICLO GLUCOSA - ACIDOS GRASOS

Randle y colaboradores (25), después de extensa experimentación animal y el estudio de seres humanos en lo que se refiere al metabolismo de Acidos Grasos, han sugerido que las anomalías de tal metabolismo (principalmente el aumento en los Acidos Grasos libres del plasma) presentes en los pacientes diabéticos, no sean la consecuencia sino la causa del trastorno hidrocarbonado.

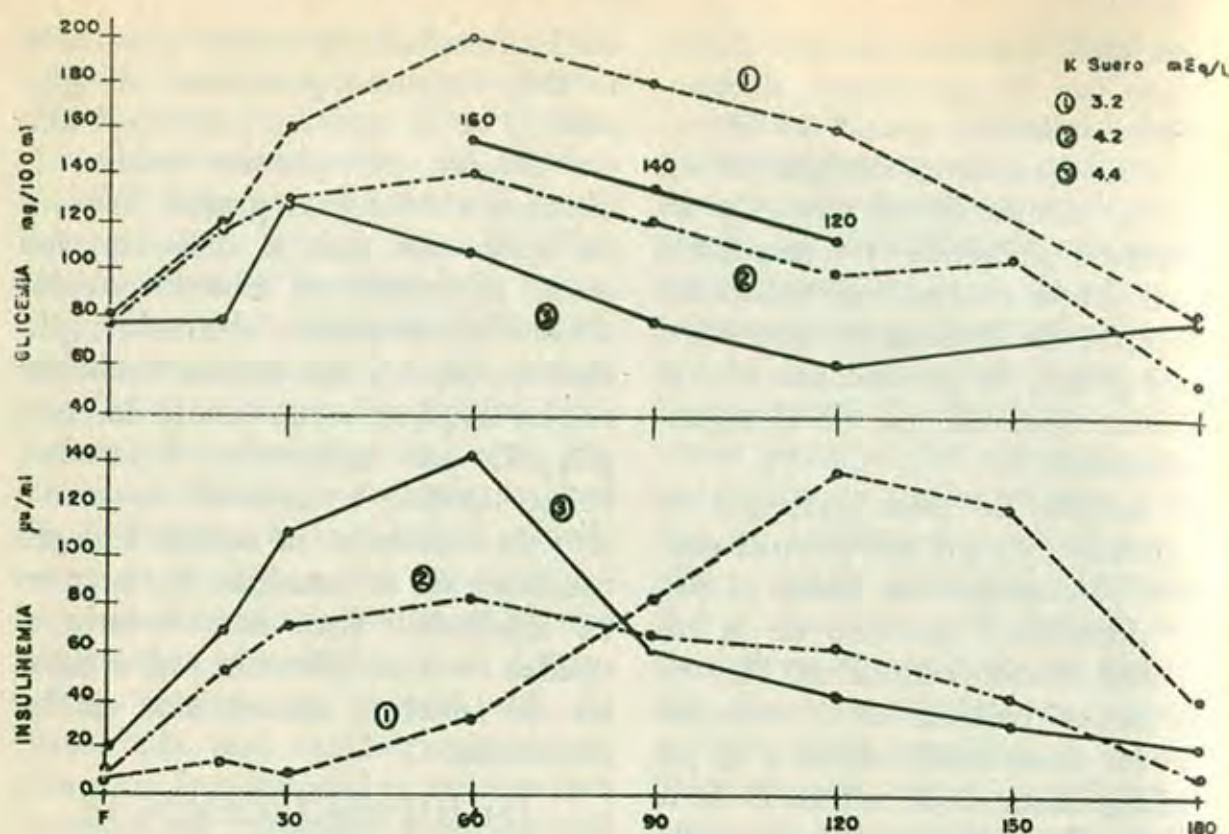
Un nivel alto de ácidos grasos libre en plasma bloquea la acción

de la Insulina en cuanto a estímulo del consumo periférico de glucosa. Por el contrario, un nivel alto de glucosa en plasma inhibe la liberación de ácidos grasos libres, y su utilización por el músculo. Así pues, solamente se liberan Acidos Grasos Libres cuando el nivel de glucosa es bajo, y las células musculares los emplean como fuente de energía. Si, por razones no aclaradas, existe lipólisis a un nivel normal o alto de Glicemia, la acción hipoglucemiante de la Insulina liberada será inhibida. Esto nos llevaría al cuadro de hiperglicemia - altos niveles de Insulina encontrados en los diabéticos.

D) HIPERGLICEMIA E HIPOPOTASEMIA

A estos conceptos nos parece importante agregar los hechos observados por CONN y colaboradores (26), recientemente.

Partiendo de su observación publicada en 1964 (27) sobre la existencia de Intolerancia a los hidratos de Carbono en los pacientes con Aldosteronismo primario y de la observación hecha inicialmente por Wolff y colaboradores sobre la aparición de hiperglicemia en los sujetos tratados con tiazidas (28), el autor desprende un factor común, la hipopotasemia como causa de la hiperglicemia.



En la figura 4, tomada de CONN se puede ver los niveles de glucosa y de Insulinemia durante tests de tolerancia a la glucosa en un paciente con Aldosteronismo primario, antes de toda terapia, después de sobrecarga de Potasio y por último una vez removido el tumor. Parece claro que los niveles de Potasio están en relación con los de Glucosa y con la velocidad en la aparición de un aumento en los niveles de Insulina.

Aun cuando de estos datos y cuidadoso estudio de estadísticas de autopsias y dosificaciones de Renina en Plasma, el Dr. CONN llega a la conclusión que un número importante de los hoy llamados diabéticos son portadores de un tumor productor de Aldosterona es también posible que parte de tales sujetos

tengan un aumento secundario de su secreción de Aldosterona, sin relación con tumor, y también presentan hipopotasemia e hiperglicemia. Todo esto abre un campo interesante, ya que se ha mostrado claramente que las Tiazidas producen un descenso (o un retardo) en la síntesis o liberación de la Insulina. (29). Es necesario más experimentación para afirmar que tal efecto se hace a través de la hipopotasemia y no por acción directa de las Tiazidas sobre la célula pancreática.

De los hechos expuestos podemos sintetizar un cierto número de ideas:

1 — Parece indiscutible que el plasma de los sujetos diabéticos contiene un factor (o sustancia) capaz de oponerse a la acción de la Insulina sobre la célula muscular.

En el caso de ANTONIADES se trata del Complejo Insulínico; en el de Vallance-Owen del Antagonista (sinalbúmina) y en la teoría de Randle del nivel elevado de los Ácidos grasos libres del plasma.

b) Si aceptamos esto, y la transmisión genética de la Diabetes, podemos suponer que, desde el nacimiento hasta el momento en el cual hallamos trastornos del metabolismo hidrocarbonado, existe un estado de resistencia dinámica que consiste esencialmente en un aumento de la síntesis y liberación de Insulina. Es de suma importancia recordar que durante tal período ya pueden existir lesiones vasculares. Esto puede relacionarse con el hallazgo del Antagonista de Vallance-Owen en 36 de 65 pacientes con familia diabética, la mayoría sin trastornos del metabolismo glucídico y en 19 de 28 pacientes con trastor-

nos coronarios (contra 9 en el grupo control). De confirmarse estos hallazgos, el Antagonista podría considerarse como el primer "marcador" genético conocido de la Diabetes Mellitus.

c) Por último todo esto nos conduce a no confundir hiperglicemia con Diabetes Mellitus (una vez más aceptando tal denominación únicamente para la enfermedad genéticamente transmitida). Existen seguramente mecanismos variados que pueden conducir a una disminución de la tolerancia a los hidratos de carbono. Sin hablar de las hiperfunciones adrenales o hipofisarias o las hiperglicemias posteriores a una lesión pancreática es muy probable que un déficit en Potasio, o un nivel elevado de Ácidos Grasos Libres en plasma conduzcan a situaciones parecidas a la Diabetes, con posible déficit de Insulina pero sin trastornos vasculares.

AUTOR - METODO	Antes de estímulo	Valor máximo	Referencia
	con glucosa microunidades/ml.	después de glucosa	
YALOW - BERSON Ensayo inmunológico	15-20	100-140	(12)
VALLACE - OWEN - SELTRER y SMITH Diafragma	59	573	(30)
POWER - REYES-LEAL y CONN Epidídimo de rata	100	200	(15)

BIBLIOGRAFIA

1. VON MERING J. y MINKOWSKY O. Diabetes Mellitus nach pankreas extirpation. *Centralbl. F. Klin. Med.* 10: 393-394, 1889.
2. BANTING F. C., BEST C. H. The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. & Clin. Med.* 7: 251-266, 1922.
3. CLAUDE BERNARD. Sur le mécanisme de la formation du sucre dans le foie. *Comptes rend. de l'Acad. des Sciences.* 24 Septembre 1855.
4. BORNSTEIN J. TREWHELLA P. Plasma Insulin levels in Diabetes Mellitus in man. *Austr. J. Exper. Biol.* 28: 569-572, 1950.
5. GEMMILL C. L. The effects of glucose and of Insulin on glucose utilization by isolated muscles. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 68: 50-62, 1941.
6. GROEN J., KAMMINGA C. E., WILLEBRANDS A. F., BLICKMAN J. B., Evidence for the presence of Insulin in blood serum. A method for an approximate determination of the Insulin content of blood. *J. Clin. Invest.* 31: 97, 1952.
7. RANDLE P. J. Assay of plasma-insulin activity by rat diaphragm method. *Brit. Med. J.* 1: 1237-1240, 1954.
8. VALLANCE-OWEN J. HURLOCK, B. Estimation of plasma Insulin by rat diaphragm method. *Endocrinology.* 60: 625-633, 1957.
9. MARTIN D. B., RENOLD A. E., DAGENAIS Y. M. An Assay for Insulin-like-activity using rat adipose tissue. *Lancet* 2: 76-77, 1958.
10. RENOLD A. E., MARTIN D. B., DAGENAIS Y. M. STEINKE J., NICKERSON R. J., SHEPS M. C. Measurement of small quantities of Insulin-like-activity using rat adipose tissue. I. A proposed procedure. *J. Clin. Invest.* 39: 14-87, 1960.
11. ARQUILLA E. R. RODARI T. y CROSIGNANI P. G.: Determinazione immunologica dell' insulina plasmatica. *Aspetti metodologici.* *Arch. Sci. Med.* 100: 471-470, 1960.
12. YALOW R. S. y BERSON S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39: 11-57, 1960.
13. SAMOLS E. y BILKUS D. A comparison of Insulin immunoassays. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 115/1: 79-84, 1964.
14. HALES C. N. Plasma Insulin in Diabetes. *Ciba Colloquia on Endocrinology.* 15: 140-155, 1964.
15. POWER L., REYES-LEAL B. y CONN J. W. Serum Insulin-like activity in genetic and experimental Diabetes Mellitus. *Metabolism.* 13: 1297-1309, 1964.
16. STEINKE J., CAMERINI R., MARBLE A. y RENOLD A. E. Elevated levels of serum Insulin-like activity (ILA) as measured with adipose tissue in early untreated Diabetes and Prediabetes. *Metabolism.* 10: 707-711, 1961.
17. ANTONIADES H., BEIGELMAN P. M., TRANQUADA R. B. y GUNDERSEN K. Studies on the state of Insulin in blood: free Insulin and Insulin complexes in human sera and their in vitro biological properties. *Endocrinology.* 69: 46-54, 1961.
18. ANTONIADES H. y GUNDERSEN K. Studies in the state of Insulin in blood: materials and methods for the estimation of "free" and "bound" Insulin-like activity in serum. *Endocrinology.* 70: 95-98, 1962.
19. ANTONIADES H., GUNDERSEN K., BEIGELMAN P. M., PYLE H. M. y BOUGAS J. Studies on the state, transport and regulation of Insulin in human blood. *Diabetes.* 11: 261, 1962.
20. ANTONIADES H. "Bound" Insulin and tissue resistance to Insulin. *Lancet.* 159-160, July 24 1965.
21. SAMAAAN N. A., DEMPSTER W. J., FRASER y STILLMAN D. Immunological studies on two forms of circulating Insulin. *Biochem. J.* 82: 29 P., 1962.

22. VALLANCE-OWEN J., HURLOCK B. y PLEASE N. W. Plasma Insulin activity in Diabetes Mellitus measured by the rat diaphragm technic. *Lancet*. 2: 583-87, 1955.
23. VALLANCE-OWEN J. y ASHTON W. L. Cardiac infarction and Insulin antagonism. *Lancet* 1, 785, 1963.
24. VALLANCE-OWEN J. y ASHTON W. L. Inheritance of essential Diabetes Mellitus from studies of the synalbumin insulin antagonist. *Diabetes*. 12: 356, 1963.
25. RANDLE P. J., HALES C. N., GARLAND P. B. y NEWSHOLME E. A. The glucose fatty-acid Cycle. Its role in Insulin insensitivity and the metabolic disturbances of Diabetes Mellitus. *Lancet* 1, 785, 1963.
26. CONN J. W. Hypertension, the Potassium ion and impaired carbohydrate tolerance. *New Engl. J. of Med.* 273: 1135-1143, 1965.
27. CONN J. W., KNOPF R. F. y NESBIT R. M. Clinical characteristics of Primary Aldosteronism from analysis of 145 cases. *Am. J. of Surgery*. 107: 159-172, 1964.
28. WOLFF F. N., PARMLEY W. W., WHITE K. y OKUN R. Drug induced Diabetes. Diabetogenic activity of long term administration of Benzothiadiazines. *J. Am. Med. As.* 185: 864-74, 1963.
29. FAJANS S., FLOYD J. C. Jr., KNOPF R. F., RULL J., GUNTSCHKE E. y CONN J. W. Evidence that decreased insulin secretion contributes to benzothiadiazine-induced hyperglycemia. Program of the 47th Meeting of the Endocrine Society, New York City. P. 66, June 17-19, 1965.
30. SELTZER H. S. y SMITH W. L. Plasma Insulin activity after glucose. An index of insulogenic reserve in normal and diabetic man. *Diabetes* 8: 417, 1959.