

11282



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

CONTROL GLUCEMICO, SENSIBILIDAD A LA INSULINA Y
SECRECION DE LA MISMA EN PACIENTES CON DIABETES
MELLITUS TIPO 2 Y SOBREPESO, TRATADOS CON
GLIBENCLAMIDA, METFORMIN Y LA MEZCLA DE AMBOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

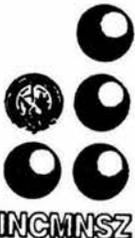
P R E S E N T O

ALFONSO GULIAS HERRERO

ASESOR DE LA TESIS: CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS

COTUTORES: FRANCISCO JAVIER GOMEZ PEREZ

JUAN ANTONIO RULL RODRIGO



MEXICO, D. F.

OCTUBRE DE 2005

0352046



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

ÍNDICE

Índice	1
Resumen	2
Introducción	5
Fisiopatología	5
Tratamiento	9
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivos primarios	20
Objetivos secundarios	21
Material y métodos	22
Estructura del estudio	22
Criterios de inclusión	24
Criterios de exclusión	24
Criterios de eliminación	25
Número de sujetos	25
Descripción de la evaluación metabólica	26
Técnicas de laboratorio	27
Análisis de datos	28
Resultados	30
Características de los pacientes	30
Control glucémico	31
Control glucémico por tratamiento	32
Insulina sérica	33
Número de pacientes controlados	34
Peso corporal	35
Eventos adversos	35
Modelo mínimo	35
Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa oral	37
Curva de glucosa e insulina antes y después de los tratamientos	39
Valores obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa oral	43
Hemoglobina glucosilada, perfil de lípidos, lactato y piruvato	44
Discusión	47
Bibliografía	55

RESUMEN

El tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 ha sufrido modificaciones en los últimos años en algunos países. Estos cambios han consistido en la reutilización de las biguanidas como terapia en pacientes con sobrepeso y más recientemente se ha puesto mayor atención en el uso de mezcla de sulfonilureas y biguanidas. En nuestro país, se han utilizado de esta manera desde hace mucho tiempo. La forma en que se han recomendado, radica básicamente en el peso del paciente, así, las biguanidas se recomiendan en los pacientes con sobrepeso; las sulfonilureas en aquellos cuyo peso se encuentre discretamente por arriba o abajo del peso ideal y la mezcla se ha utilizado en los pacientes en que la monoterapia no ha sido suficiente para lograr el control glucémico. El propósito de este estudio es valorar la existencia de algún predictor de respuesta a los hipoglucemiantes orales y examinar el efecto que se produce sobre la sensibilidad y secreción de la insulina en pacientes con diabetes tipo 2 y sobrepeso, al utilizar metformín, glibenclamida y la mezcla de ambos.

Se estudiaron 12 pacientes (5 H, 7 M) con edad promedio de 56.4 ± 6.1 años; con menos de 10 años de evolución de la diabetes; con índice de masa corporal (IMC) de 27.6 ± 3.1 kg/m²; sin otras enfermedades concurrentes y que presentaran glucosa en suero mayor a 140 mg/dL después de un período de 6 semanas de dieta isocalórica. Los pacientes fueron asignados en forma aleatoria a cualquiera de tres secuencias posibles de tratamiento. En cada una de las mismas, se administraron los tres medicamentos objeto del estudio. Así, cada paciente recibió los tres tratamientos por espacio de 10 semanas con cada uno de los medicamentos y con un período de lavado de 6 a 12 semanas entre dichos períodos de tratamiento. Al inicio y al final de cada período se llevó a cabo una valoración metabólica que consistió en la realización de modelo mínimo para medir sensibilidad a la insulina (Si), respuesta aguda de insulina (AIRg) y efectividad de la glucosa (Sg). Curva de tolerancia a la glucosa oral para la medición del índice de sensibilidad a la insulina (ISI), área bajo la curva de glucosa (AUCg), área bajo la curva de insulina (AUCi) y el área bajo la curva de péptido C (AUCpc). Por otro lado, se realizó medición en suero de hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, apoproteínas A1 y B, lactato y piruvato.

Se descartó el efecto de la secuencia o efectos residuales de los tratamientos previos. Los resultados obtenidos muestran que el 83% (10 pacientes) del grupo que recibió la mezcla, logró el objetivo de control glucémico (<140mg/dl). Del grupo que recibió glibenclamida, alcanzó el objetivo de control en el 41 % (5 pacientes) de los sujetos

y en el grupo que recibió metformín, tan sólo el 8% de los sujetos alcanzó tal objetivo (2 pacientes), diferencia estadísticamente significativa, con un valor de $p < 0.01$. El promedio de tabletas con la mezcla fue de 2.25, con glibenclamida 3.33 y con metformín 3.66, diferencia también significativa, con valor de $p < 0.02$. La glucosa en suero promedio antes y después del tratamiento en el grupo que recibió metformín fue 215.4 ± 58 mg/dL y 182.2 ± 49 mg/dL, respectivamente. En el grupo asignado a recibir glibenclamida los valores antes y después del tratamiento fueron 208.1 ± 57 mg/dL y 159.2 ± 63 mg/dL, respectivamente. En el grupo en el que se administró la mezcla los valores de glucosa antes y después del período de tratamiento fueron 237.8 ± 67 mg/dL y 129.5 ± 40 mg/dL respectivamente. Todas estas diferencias tuvieron valor estadístico. No se observaron cambios de importancia en el peso, aunque en todos se observó la tendencia a aumentar levemente.

En las valoraciones metabólicas se observó que no hubo diferencias importantes en Si y Sg entre los grupos y después de los tratamientos. El ISI tampoco mostró cambios de consideración aunque se observó una disminución en todos los grupos, salvo cuando se analizó por separado el grupo alcanzó el objetivo de control independientemente del tratamiento utilizado, contra el grupo no lo alcanzó. Todos los parámetros medidos fueron similares cuando se compararon los períodos basales. Los que cambiaron después del tratamiento fueron AIRg, la cual mostró que el grupo mejor controlado tuvo un nivel mayor, que además, presentó una correlación negativa con los valores de glucosa ($r = -0.45$, $p < 0.01$). Otro parámetro fue el AUCg y AUCi, donde el primero mostró una disminución importante después del tratamiento y el segundo aumentó en todos los grupos. AUCpc no mostró diferencias significativas, aunque se observó un aumento en todos los grupos. Estos cambios fueron mas importantes en el grupo con mezcla que con los medicamentos por separado. Los índices insulina/glucosa y glucosa/insulina mejoraron con los tratamientos, siendo mas importantes los cambios con la mezcla.

En cuanto a los otros parámetros metabólicos, se observaron cambios importantes cuando se asoció al objetivo de control alcanzado, no con relación al medicamento utilizado. Los mas importantes fueron los cambios en hemoglobina glucosilada, triglicéridos, apoproteína A1, lactato y piruvato.

La mejoría en el control de la glucemia se asocia a un incremento en la producción de insulina, no a la mejoría de la sensibilidad. En este grupo de pacientes la mezcla fue la mejor opción para lograr el control y no se observó que algún parámetro pudiera servir como predictor de respuesta al corto plazo. La conclusión es que en

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ALFONSO GUILASHERRE

FECHA: 03/11/65

FIRMA: [Firma manuscrita]

pacientes con hiperglucemia de moderada a grave, la mezcla es el tratamiento de elección, quedando el metformín como indicación en caso de intolerancia a la glucosa de ayuno o por curva de tolerancia a la glucosa oral y en hiperglucemia leve y las sulfonilureas para los pacientes que cursan con hiperglucemia moderada.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos (1, 2), asociadas con la deficiencia absoluta o relativa en la secreción y/o acción de la insulina. Lo anterior conduce a la aparición de trastornos en el metabolismo y en la micro- y macrovasculatura que afectan a la mayor parte de los órganos y las funciones que estos desarrollan en el cuerpo humano (3).

En algunos casos se han podido establecer las causas que propician la aparición de esta enfermedad, sin embargo, para los grupos mayores de pacientes, esto aún no se conoce con certeza, por lo que se han hecho clasificaciones basadas principalmente en las características clínicas de los enfermos (4). Así, los dos grupos más numerosos son la diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) y la tipo 2 (DM-2).

La diabetes mellitus es una de las enfermedades crónicas más comunes ya que en la población caucásica tiene una incidencia del 2% en la población general. La DM-2 sobrepasa en frecuencia a la tipo 1, al presentar una tasa de incidencia hasta 10 veces mayor. La prevalencia de la DM-2 varía de acuerdo con el grupo étnico estudiado. Así se ha observado, que algunos grupos como los aborígenes australianos tienen una prevalencia menor al 5%, al igual que en China y Japón (5). Sin embargo, en otros grupos como los México-americanos, ésta es del 13% y en los indios Pima es mayor al 55% en las personas comprendidas en el grupo de edad que abarca entre los 45 y 54 años. (6). En México la prevalencia de esta enfermedad se ha establecido a través de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, en la cual se ha observado que en el grupo de edad que comprende entre los 40 y 69 años, ésta es del 16% y es mayor al 20% en los mayores de 50 años. La prevalencia se incrementa en forma considerable conforme aumenta el índice de masa corporal (IMC), así, cuando éste se encuentra entre 25 y 29.9 kg/m², la prevalencia es del 4.1%, entre 29.9 y 34 es del 11.2% y mayor del 14% cuando el índice es superior a los 35 kg/m² (7).

FISIOPATOLOGÍA

La etiología de éste padecimiento es heterogénea, observándose diversas facetas que pueden contribuir a una expresión diferente en cada paciente. Así, se ha determinado que existe susceptibilidad genética, aún no establecida en forma clara para todos los grupos de enfermos; se ha asociado a diferentes estilos de vida y alimentación; aparece en diferentes grupos de edad; se relaciona a patrones diversos de secreción y

sensibilidad a la insulina; existe sobreposición con la DM-1 autoinmune; se han observado diferencias en la expresión clínica, etnicidad y distribución geográfica; además se ha asociado a embarazo y a diferentes factores que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (8). Cualquiera que sea el factor etiopatogénico principal, este se manifiesta al actuar sobre procesos fisiológicos importantes que intervienen en la homeostasis de la glucosa, que son la secreción pancreática de insulina y la sensibilidad a la misma en los tejidos periféricos. Aún no se ha podido establecer cual de estos dos mecanismos es el que primero se afecta o el más importante, pero se ha observado, que la alteración en uno de ellos, provoca el mal funcionamiento del otro. Algunos autores sugieren que ambos procesos aparecen en las fases iniciales del estado prediabético.

El mantenimiento de una concentración estable de glucosa en plasma depende de la retroalimentación que ocurren entre las concentraciones circulantes de glucosa y el islote pancreático. La glucosa en el estado de ayuno, se produce únicamente en el hígado, a través de la glucógenolisis y la gluconeogénesis. Así, la tasa de producción en este estado, depende de la disponibilidad de glucógeno y de precursores gluconeogénicos.

La glucosa es utilizada principalmente por los tejidos insensibles a la insulina como el cerebro y en menor proporción por los que dependen de la acción de la insulina como el músculo y el adipocito (9). Un gran número de factores neurales y hormonales regulan la producción hepática de glucosa y en la presencia de cantidades adecuadas de insulina, la glucosa por sí misma puede controlar la producción hepática de sí misma (10). La regulación a corto plazo la lleva a cabo la insulina, el glucagon y las catecolaminas, mientras que a largo plazo, al influir sobre la producción hepática de glucosa, actúan la hormona del crecimiento, las hormonas tiroideas y el cortisol. El hígado es sensible a los cambios en las concentraciones de insulina y glucagon. Cuando ocurre una disminución en la concentración de insulina, aumenta la producción hepática de glucosa y esto a su vez, provoca hiperglucemia. Ocurre lo contrario cuando disminuye la concentración de glucosa (11). Si la retroalimentación se encuentra intacta, la concentración original de glucosa será restaurada.

En el caso que exista una condición que produzca un incremento en la resistencia a la insulina como ocurre en la obesidad, se observará un cambio adaptativo que se refleja también como hiperglucemia. Sin embargo, dada la capacidad de la célula β pancreática de funcionar como sensor, al detectar este cambio se producirá un incremento en la secreción de insulina y disminución de la secreción de glucagon y

provocará de esta manera, una disminución en la producción hepática de glucosa y un aumento en la captación periférica de la misma, con lo que la concentración de la glucosa se normalizarán a expensas de producirse hiperinsulinemia.

En el período postprandial se favorece la entrada de la glucosa al hígado y a los tejidos periféricos sensibles a insulina. Los cambios en la secreción de esta hormona y del glucagon, los responsables que esto ocurra, están influenciados por los sustratos glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. La glucosa además modula las respuestas a las otras sustancias, así como a los factores neurales e intestinales liberados durante la ingestión de nutrientes.

Las concentraciones de insulina plasmática se han informado como disminuidas, normales e incluso elevados en pacientes con DM-2 (12). Sin embargo, cuando los sujetos se agrupan por grado de obesidad y glucemia, se hace aparente la deficiencia en la secreción basal de insulina (13,14). Así mismo, la secreción de insulina estimulada en forma aguda por la glucosa se encuentra alterada y este efecto es tan marcado, que al tiempo en que ocurre la hiperglucemia de ayuno se pierde la primera fase de la secreción de insulina. Por otro lado, una anomalía igualmente importante ocurre en la función de la célula β y es la capacidad reducida de la glucosa para potenciar la respuesta secretora de insulina en respuesta a los factores neurales, hormonales y los sustratos que no son carbohidratos (15,16). Estos secretagogos son importantes para mantener las concentraciones basales y postprandiales de insulina, las cuales a su vez son los factores principales para mantener la homeostasis de la glucosa. Esta capacidad se pierde cuando la concentración sérica de glucosa excede el umbral renal (>250 mg/dL). Con modelos matemáticos se ha demostrado un defecto en la capacidad de respuesta de la célula β a concentraciones máximas de glucosa, compatible con una alteración en la función secretora de la misma, mientras que la sensibilidad del islote a la glucosa, no sufre cambios. La magnitud de este defecto se relaciona en forma cercana al nivel de glucosa plasmática de ayuno, así, los sujetos con hiperglucemia grave, presentan menor capacidad de respuesta de la célula pancreática a la glucosa.

En estudios de sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos se ha demostrado en sujetos obesos con DM-2, que la captación de glucosa se encuentra muy disminuida (17), lo cual puede ser compatible con una reducción en el número de receptores celulares a la insulina o con defectos al nivel post-receptor (18). Esta última anomalía es la determinante principal de la gravedad de la resistencia periférica a la insulina en diabéticos no tratados. La glucosa, por la ley de acción de masas, es capaz de amplificar

la captación de los tejidos periféricos (19), lo que puede funcionar como un mecanismo de compensación que resulta excesivo cuando se combina con un incremento en la producción hepática de glucosa. Se ha demostrado además, que un defecto en la acción de la insulina existe en el hígado de estos pacientes, dado principalmente por disminución en la sensibilidad. Por otro lado, la glucosa pierde la capacidad de inhibir su propia liberación a partir del hígado, incrementándose así, la hiperglucemia de ayuno.

La producción hepática de glucosa está acoplada en forma estrecha a la captación muscular inducida por el ejercicio, de manera que los niveles circulantes de glucosa generalmente no se perturban aún cuando la utilización de la misma se incremente. En ciertas circunstancias, sin embargo, la concentración de glucosa se puede desviar de los niveles en reposo, aún en personas normales. Durante el ejercicio prolongado, gradualmente disminuye el almacén de carbohidratos, lo que lleva a una disminución de los niveles de glucosa sanguínea, mientras durante el ejercicio intenso, un aumento de la glucemia significa que la producción de glucosa sobrepasa a su metabolismo.

La concentración de glucosa en ayuno y la tasa basal de producción hepática de glucosa, se relacionan positivamente en sujetos con DM-2 (20-23). Algunas intervenciones terapéuticas para disminuir la glucemia, se asocian a la disminución en la producción hepática de glucosa, observándose una correlación lineal entre los dos eventos (24).

La disminución de la concentración periférica de insulina y de su sensibilidad favorece la movilización de ácidos grasos a partir del adipocito los cuales se utilizan como sustratos gluconeogénicos en el hígado (25). Por otro lado, la inhibición de la secreción de glucagón por parte de la glucosa, se encuentra también afectada, contribuyendo así, al funcionamiento anormal de la retroalimentación que ocurre en la célula pancreática (26).

El tercer factor y tal vez el más importante, en cuanto a la anomalía observada en la producción hepática de glucosa, parece ser la alteración en la secreción de insulina combinada con una sensibilidad a la misma disminuida al nivel del tejido hepático.

Recientemente se ha postulado que la disminución en la secreción de insulina está mediada por el fenómeno de glucotoxicidad, en el que las concentraciones elevadas de glucosa disminuyen tanto la capacidad funcional de la célula β como la estructural, manifestada por la disminución en la expresión del transportador de glucosa GLUT 2, sin embargo, esto sólo se ha podido estudiar en animales (27).

Otro proceso que parece intervenir en la disminución de la sensibilidad a la insulina es la edad, sin embargo, en ésta se observa que la producción endógena de glucosa aún

puede ser inhibida, por lo que uno de los mecanismos compensadores no se presenta y así, la hiperglucemia no es tan marcada. Además, en sujetos obesos con alteración en la sensibilidad, no se demostró una mayor alteración en la misma, conforme aumentó la edad (28).

TRATAMIENTO

Cualquier intervención que amplifique la secreción de insulina y/o la sensibilidad a la misma en el nivel hepático, periférico o ambos, mejorará la tolerancia a la glucosa y reducirá la hiperglucemia de ayuno. El paciente obeso se beneficia de la pérdida de peso, lo que aumenta la sensibilidad a la insulina y en algunos con pobre función de célula β y con hiperglucemia, aumenta las concentraciones de insulina (33). Sin embargo, el mayor efecto de la reducción de peso se observa durante el período de restricción calórica, donde se reduce la liberación de glucosa al disminuir el glucógeno hepático, además de que la gluconeogénesis hepática disminuye, pues la restricción calórica disminuye la resistencia. Cuando se logra la estabilización del peso, las reservas de glucógeno aumentan, se incrementa la producción hepática de glucosa y las concentraciones plasmáticas de ésta tienden a aumentar. Así que la disminución total de la concentración de glucosa está dada por una mejoría de la sensibilidad a la insulina. Se ha visto que se necesitan al menos 10 Kg de descenso de peso para observar un efecto benéfico en la sensibilidad a la insulina inducida por la dieta (34). La restricción calórica es más efectiva que la pérdida de peso y estos dos efectos no deben confundirse. En la práctica clínica, lograr la restricción calórica prolongada necesaria y la pérdida de peso es extremadamente difícil, debido a la falta de indicaciones adecuadas y aplicables y a la falta de apego de los pacientes poco motivados, por lo que otras alternativas terapéuticas deben ser empleadas.

Ha sido evidente que el aumento de la capacidad de ejercicio a largo plazo, es un factor que disminuye la incidencia de la enfermedad especialmente en aquellas personas con alto riesgo de padecerla. Por otro lado, la prevalencia de la diabetes en el grupo de individuos sedentarios es del doble cuando se compara con sujetos físicamente activos apareados por edad y sexo.

El paciente con diabetes mellitus tipo 2 que no presenta complicaciones vasculares, debe poder practicar un ejercicio como lo hace un sujeto normal. Las sesiones aisladas de ejercicio, incrementan la sensibilidad a la insulina tanto al nivel esplácnico como al periférico. El ejercicio es útil en el control de la glucemia en pacientes diabéticos

tipo 2, además de estos beneficios metabólicos, se pueden lograr otros al nivel cardiovascular y psicológico, sin embargo, esta recomendación se basa en la premisa que los beneficios esperables por el ejercicio deben sobrepasar a los riesgos, así, en los pacientes en que se detecte algún riesgo específico por la práctica de deporte, si no puede efectuarse alguna maniobra que minimice el riesgo, es preferible que no se practique.

En aquellos pacientes en que la restricción calórica, el ejercicio y la pérdida de peso no han sido suficientes para lograr los objetivos de control de la glucemia, se deben utilizar medicamentos. En la actualidad, los tratamientos con los que se dispone, son el empleo de las sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la α -glucosidasa, recientemente se han incluido a las tiazolidinedionas, las meglitinidas y se encuentran en fases experimentales los inhibidores de la dipeptidilpeptidasa IV (DPP-IV). Se han promovido las mezclas de estos medicamentos aprovechando los que tienen mecanismos de acción diferentes, los cuales parecen ser aditivos (35). La insulina en todas sus formas se reserva para los pacientes de este grupo que presentan algún descontrol grave o en aquellos en que la terapia con hipoglucemiantes orales ha fracasado.

Sulfonilureas

Las sulfonilureas son compuestos relacionados a sulfonamida, que fueron descubiertos casualmente en 1942, cuando el gliptiazol era utilizado en el tratamiento de la fiebre tifoidea. Su empleo en la diabetes mellitus comienza en 1955, cuando las sulfonilureas de primera generación como la acetohexamida, tolbutamida, tolazamida y cloropropamida fueron creados a partir del precursor antes mencionado, al disminuir la toxicidad y al aumentar la potencia hipoglucemiante (36). Modificaciones subsecuentes a estos compuestos, dieron origen a la glipizida, glibenclamida y glicazida, conocidas también como sulfonilureas de segunda generación (37).

El mecanismo de acción de estos medicamentos puede dividirse en efectos pancreáticos (38) y extrapancreáticos. Los efectos pancreáticos que ejercen son debidos a la estimulación de un receptor de membrana específico que se encuentra acoplado a canales de potasio sensibles a ATP, que en condiciones normales establecen el potencial de reposo de la membrana de la célula β (39). Así, la activación de este receptor, inhibe la salida de potasio de esta célula, despolarizándola, lo cual a su vez, activa uno o varios canales de calcio tipo L (40). El influjo de calcio resultante, desencadena la exocitosis y liberación de insulina (41). Este receptor ha sido clonado recientemente y parece

pertenecer a la súperfamilia de las ATPasas, capaz de sensor los niveles de ATP y ADP intracelulares, afectando así, la actividad de los canales de potasio. Este último mecanismo es el empleado por la glucosa y otros nutrientes para estimular la secreción de insulina (42). A diferencia de la glucosa, las sulfonilureas no parecen estimular la secreción de proinsulina, puede llegar incluso a inhibirla. Por tal razón, el efecto de éstos parece ocurrir tan sólo en la fase I de la secreción de insulina (fase rápida) y no tienen efecto en la fase II o de secreción lenta (43,44).

Entre los efectos extrapancreáticos, se han descrito varios que involucran la acción directa de los fármacos y otros a través del aumento de la secreción de insulina. Sin embargo, en ausencia de insulina, estos efectos no parecen tener relevancia clínica. En el hígado se ha descrito un aumento en las concentraciones de fructosa 2,6 difosfato, aumento de la actividad de la glucólisis, disminución de la actividad de la gluconeogénesis, decremento en la extracción hepática de insulina (45,46) y una disminución en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (47-51). En el músculo se ha descrito el aumento en el transporte de glucosa y en la concentración de fructosa 2,6 difosfato (52,53). En el tejido adiposo, puede producir el incremento en la concentración de la diesterasa de AMPc, inhibición de la lipólisis y aumento en la actividad de la glucógeno sintetasa (54-56). Existen estudios en los que se observa que el efecto de las sulfonilureas al potenciar la actividad de la insulina al nivel hepático y muscular contribuye al efecto antidiabético (57-62).

Así, el efecto principal de las sulfonilureas es aumentar la secreción de insulina, esta respuesta es mayor, conforme la concentración de glucosa plasmática es mayor. Esto disminuye la glucotoxicidad, disminuye también la resistencia a la insulina, por lo que a la postre, se observa una disminución en la secreción de insulina, comparada con los valores pre-tratamiento. Esto es, que la menor insulina liberada es mas eficiente (63-69). En el tratamiento crónico, no se produce hiperinsulinemia (70-74). El efecto benéfico de las sulfonilureas sobre las concentraciones elevadas de colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos, parece lograrse por un mejor control glucémico y no por un efecto hipolipemiente intrínseco de estos compuestos (75,76).

La indicación principal de las sulfonilureas es en pacientes con DM-2 con función de la célula β adecuada y que no han alcanzado el control deseado con dieta y ejercicio. Estos pacientes deben tener un peso normal o ser obesos, ya que los delgados probablemente requieran el uso de insulina. Los pacientes con menos de 5 años de evolución de la enfermedad son los que más probabilidades tienen de responder, sin

embargo, del 15 al 20% de los sujetos con reciente diagnóstico, no responden (falla primaria). Cada año de tratamiento, del 3 al 5%, pierden el efecto (falla secundaria). Para lograr el objetivo del tratamiento, se debe indicar el seguimiento de una dieta adecuada, pues de otra manera, la tasa de aparición de fallas secundarias a tratamiento es mayor. Las contraindicaciones principales son la ausencia de páncreas endócrino funcional (DM-1, pancreatomectomía, etc.), embarazo, cirugía mayor o trauma, infecciones graves, hipersensibilidad a los derivados de las sulfas o predisposición al desarrollo de hipoglucemia grave.

Las interacciones medicamentosas son múltiples, las que inducen un efecto mayor incluyen: desplazamiento de la unión a albúmina (aspirina, fibratos y trimetoprim); inhibición de su metabolismo (alcohol, bloqueadores H-2, anticoagulantes); inhibidores de la excreción urinaria (probenecid, alopurinol); y antagonistas de hormonas contrarreguladoras (beta-bloqueadores, drogas simpotolíticas). Los que disminuyen su acción hipoglucemiante, lo hacen a través de aumentar su metabolismo (barbitúricos y rifampicina); inhibidores de la secreción de insulina (tiazidas, diuréticos de asa, beta bloqueadores y fenitoína); y los inhibidores de la acción de insulina (corticoesteroides, hormona del crecimiento, estrógenos y catecolaminas).

El efecto indeseable principal es la hipoglucemia, mas frecuente con las sulfonilureas de segunda generación. Se observa principalmente en mayores de 65 años, desnutridos, con enfermedades concurrentes, enfermedad crónica hepática, renal o cardiovascular y el uso concomitante de otras drogas.

Otros efectos adversos son principalmente al nivel gastrointestinal (nausea, vómito o malestar abdominal) en el 1 al 3%; reacciones cutáneas en el 0.5 a 1.5% y en raras ocasiones se ha descrito anemia hemolítica, agranulocitosis, ictericia, hepatitis granulomatosa y alteraciones inmunológicas. La mayor parte ocurren en los primeros meses de tratamiento. La cloropropamida puede inducir el Síndrome de Secreción Inapropiada de Hormona Antidiurética (SIHAD), efecto que no es común a las demás sulfonilureas.

Glibenclamida.- Esta sulfonilurea de segunda generación tiene una potencia relativa de 150 comparada con las de primera generación. Su duración de acción es de 18 a 24 horas, con un pico máximo a las 4 horas. Se une en 98% a proteínas en forma no iónica. Sus metabolitos hepáticos son la 3-OH-glibenclamida y la 4-OH-glibenclamida. Se elimina por orina como los metabolitos hepáticos o sin metabolizar, en un 50%. La excreción fecal

es del 50%. La dosis hipoglucemiante varía entre 1.25 a 20 mg, dividida en una o dos tomas.

Biguanidas

La guanidina fue utilizada en 1913 cuando se demostró su efecto hipoglucemiante, sin embargo, dada su toxicidad, se crearon otros derivados que perdieron popularidad ante el advenimiento de la insulina. En los años 50's, en que las sulfonilureas fueron muy utilizadas, las biguanidas fueron nuevamente introducidas a la terapéutica. Así, en 1957 se introdujo el uso en la práctica clínica del metformin y del fenformin y en 1958 se utilizó el buformin. El fenformin se utilizó extensamente hasta los años 70's en que se asoció a acidosis láctica y en algunos países todas las biguanidas fueron retiradas del mercado. Sin embargo, en muchos otros países, se continuaron usando en forma racional, por lo que nuevamente, al no informarse de casos de acidosis láctica y observar que el uso de estos producía beneficios importantes en los pacientes con DM-2, se ha vuelto a utilizar, teniendo el metformin un lugar preponderante en la terapéutica (77,78).

No se conoce aún su mecanismo de acción, ya que cualquier proceso por el que disminuye la glucotoxicidad, mejora la sensibilidad periférica a la insulina, incrementa la secreción de la misma y disminuye la producción hepática de glucosa. Sin embargo, se sabe que aumenta la secreción de insulina. Disminuye la resistencia a la insulina tal y como lo hace la pérdida de peso, situación inducida por el fármaco. En sujetos delgados, a pesar de favorecer un mejor control, no se ha detectado mejoría en la sensibilidad periférica a la insulina (79-80). El hecho de que intervenga en la mayor parte de las acciones de la insulina, sugiere que su sitio de acción se encuentre al nivel del postreceptor, quizá en el nivel de IRS-1, aunque esto aún no se ha corroborado (81). Se ha descrito su efecto sobre varios niveles de la cascada intracelular que controla la insulina.

La principal indicación es en pacientes con diabetes mellitus que cursan con obesidad. En los casos en que se desea controlar la glucemia evitando la ganancia de peso y en quienes se desea utilizar por el efecto hipolipemiante.

Se ha utilizado en pacientes en que no se ha conseguido el objetivo de control con sulfonilureas, utilizándose así, como monoterapia o en asociación a estos fármacos. Se ha visto que en pacientes con DM-1 disminuye los requerimientos de insulina. Una indicación mas de uso es en pacientes con obesidad e intolerancia a la glucosa en quienes se ha demostrado un aumento de la resistencia a la insulina (82).

Las contraindicaciones se relacionan a la posibilidad de desarrollar acidosis láctica. Así, cualquier padecimiento que predisponga al desarrollo de acidosis metabólica, hipoxia o decremento en la excreción de estos compuestos, son considerados como contraindicaciones. La falla renal aguda, hipoxia, colapso cardiovascular, infarto agudo del miocardio, cirugía, infección grave, enfermedad hepática o historia de abuso de alcohol, proscriben el uso de estos medicamentos.

Los efectos adversos principales son de tipo gastrointestinal. Algunos se observan hasta en el 50% de los pacientes, pero por lo general son transitorios. La saciedad temprana y la hiporexia son efectos comunes que pueden ser persistentes. Los síntomas comunes y transitorios son el dolor abdominal, meteorismo, flatulencia, diarrea, náusea, vómito y sabor metálico. Los efectos raros son la deficiencia de vitamina B 12, diarrea persistente y la acidosis láctica cuando se utiliza en pacientes que cursa con alguna contraindicación formal (83). La tasa de falla primaria es del 12% y la falla secundaria del 5%. No parece haber interacción importante con otros medicamentos (84-87).

Mefformin Su absorción ocurre en el intestino delgado, en un promedio de 0.9 a 2.6 horas, con una biodisponibilidad del 50 al 60%. Su pico máximo de acción ocurre a las dos horas. Se observan concentraciones 10 a 100 veces mayores a las plasmáticas en las paredes intestinales y se concentra principalmente en el hígado, riñón y glándulas salivales. No se une a proteínas plasmáticas y se excreta en orina aparentemente sin cambios, 90% en 12 horas. La dosis máxima de empleo, es de 2.5 gramos.

Mezcla Sulfonilurea-Biguanida

En los casos en que no se logra el control con cualquiera de las sulfonilureas o mefformín, como monoterapia, se han utilizado mezclas de estos medicamentos, con éxito. En los países en los que no se ha aceptado el uso de mefformín, la siguiente alternativa es el uso de insulina, la cual es capaz de producir un buen control glucémico a expensas de provocar hiperinsulinemia. Esta se ha asociado al desarrollo temprano de macroangiopatía.

En estudios efectuados en pacientes con falla secundaria a sulfonilureas, el empleo de mefformín ha mostrado la disminución de la glucemia de ayuno y postprandial, a través de facilitar la captación periférica de glucosa y la disminución en la producción hepática de la misma (88).

En otro estudio en que un grupo de pacientes fue tratado con glibenclamida, otro con metformín y otro con mezcla de ambos fármacos a dosis altas y bajas, se observó que con los tres tratamientos se lograba un buen control, diferentes grados de insulinemia y cambios en el peso (89), sin embargo, las características de los pacientes en cada tratamiento no se especificaron, además un porcentaje muy alto de pacientes presentaron falla secundaria a monoterapia. Por otro lado con cualquier tratamiento se observó un discreto efecto benéfico sobre los niveles de lípidos. La utilización de mezcla permite emplear dosis mas bajas de cualquiera de los medicamentos, tal vez por efectos sinérgicos, con lo que disminuyen las posibilidades de observar efectos indeseables.

Meglitinidas

Estos medicamentos se unen a un receptor que se encuentra en la membrana de la célula β conocido como receptor-1 de sulfonilurea (SUR-1). Las sulfonilureas lo hacen en su sitio específico y las meglitinidas en el sitio benzamida. Este receptor es parte de un canal de potasio sensible a adenosin-trifosfato (ATP). Al unirse los medicamentos en el sitio específico, se obtiene una respuesta idéntica a la causada por el ATP, es decir, el cierre de dicho canal. Así, esto provoca la despolarización de la membrana celular y abre los canales de calcio de tipo L (dependientes de voltaje) y permite la entrada de iones de calcio que activan a las proteínas sensibles al calcio, desencadenando la exocitosis de los gránulos que contienen insulina (90).

Existen nuevos secretagogos que cierran los canales de potasio, la mitiglinida KAD-1229 actúa sobre el sitio benzamida de SUR-1. La morfolinoguanidina BTS 67582 que incrementa transitoriamente la secreción de insulina actúa parcialmente cerrando los canales de potasio. Algunos antagonistas de los receptores adrenérgicos α_2 reducen la supresión tónica de la secreción de insulina actuando sobre este receptor (91). Las imidazolininas, como S-21663 y S-22068, se pueden unir a la porción Kir6.2 del poro, cerrando el canal (92). Otras imidazolininas se pueden unir a los receptores I_1 e I_2 y probablemente a otros receptores que inhiben el canal de potasio sensible a ATP e inducir así la secreción de insulina .

Los agentes que actúan sobre este receptor pueden causar hipoglucemia. Otro problema de estos medicamentos es que no influyen directamente la biosíntesis de proinsulina o su procesamiento a insulina. Teóricamente se ha propuesto que la unión de estos medicamentos a receptores en tejido cardíaco o músculo liso vascular puede

inducir arritmias o cambios en la presión arterial. Los receptores SUR2A en cardiomiocitos y SUR2B en músculo liso vascular presentan el sitio de unión benzamida.

Recientemente se ha propuesto que la imidazolina BL11282 estimula la secreción de insulina inducida por glucosa mediante efectos en la protein-kinasa A (PKA) y C (PKC), sin afectar los canales de potasio.

Los ésteres de ácido succínico estimulan la secreción de insulina y la biosíntesis de proinsulina. Esto provee a la mitocondria de sustrato para la producción de energía y estimula la secreción de insulina en la ausencia de nutrientes mientras incrementa el efecto liberador de insulina con estimulación submáxima con glucosa y otros agentes que cierran los canales de potasio sensibles a ATP. Los efectos metabólicos de estos compuestos, generan las señales requeridas para aumentar la biosíntesis de la proinsulina en la célula β (93).

Estos compuestos tienen poca biodisponibilidad cuando son administrados por vía enteral y la duración de su acción es corta, además que no son específicos, ya que pueden afectar la gluconeogénesis en el hígado. El desarrollo de moléculas mixtas que contengan ésteres de succinato y otros tipos de agentes antidiabéticos puede solucionar este problema (94). Un abordaje relacionado se puede inducir al estimular la Succinil-CoA sintetasa mitocondrial para generar ATP y guanosin-trifosfato (GTP).

Agonistas del Receptor- γ Activado por el Proliferador de Peroxisomas (PPAR γ)

Este receptor es el sitio de acción de las tiazolidinedionas y el foco de atención de varios agentes nuevos (95). Estimulando este receptor se mejora la sensibilidad a la insulina, aunque puede no ser el único mecanismo que utilizan estos fármacos para mejorar el control glucémico. El receptor se expresa en tejido adiposo principalmente, donde promueve la adipogénesis, lipogénesis y la captación de glucosa. La estimulación del mismo altera la transcripción de diversos genes que también son sensibles a la insulina, principalmente lipoprotein-lipasa, proteína de transporte de ácidos grasos y proteínas de unión a ácidos grasos en adipocitos, la sintetasa de acil-CoA, glucocinasa, fosfoenolpiruvato-carboxikinasa y la isoforma-4 del transportador de glucosa (GLUT-4).

El efecto antihiper glucémico es debido parcialmente al incremento de lipogénesis en adipocitos, lo cual disminuye los ácidos grasos circulantes y disminuye las concentraciones de lípidos en hígado y músculo. Esto altera el ciclo de glucosa-ácidos grasos para utilizar la glucosa en el músculo. La estimulación del PPAR γ disminuye la producción de diversos mediadores que causan resistencia a la insulina como el factor de

necrosis tumoral- α y la hormona resistina. Incrementa la producción de adiponectina y las acciones de la vía de la insulina generadas por PI3K, acciones que incrementan la sensibilidad a la insulina. Existe expresión escasa en hígado y músculo, sin embargo, su actividad parece contribuir a los efectos antihiperoglucémicos.

Existe una correlación estrecha entre la afinidad de unión de las tiazolidinedionas en uso con el receptor y su efecto antihiperoglucémico, sin embargo, existen otras como MCC555 y NC2100 que son agonistas débiles, pero potentes antihiperoglucémicos. Esto sugiere que la parte de la molécula no derivada de tiazolidinediona puede tener un efecto importante para disminuir la glucosa (96). Esta misma parte de la molécula parece explicar efectos tóxicos al nivel hepático. Algunos de estos compuestos parecen ser antiaterogénicos y antitrombóticos. Recientemente algunos compuestos agonistas de este receptor, pero sin estructura de tiazolidinediona han sido incluidos dentro del estudio como potenciales agentes antidiabéticos. Los efectos principales de estos fármacos son la retención de líquidos, el edema y la ganancia de peso (97).

Otros tratamientos

En los pacientes con falla secundaria a monoterapia con sulfonilureas y a mezcla de sulfonilureas-metformín, se ha intentado la utilización de insulina en una dosis nocturna o diurna, además de continuar con el tratamiento hipoglucemiante oral. Con esto se ha observado un control glucémico adecuado a expensas de hiperinsulinemia, la cual es aparentemente menor con la dosis nocturna (98-99). Con la progresión de la enfermedad, la respuesta a los hipoglucemiantes orales se pierde, por lo que el tratamiento sustitutivo con insulina es el siguiente paso. Se ha visto que con la administración de ésta por períodos cortos de tiempo, se puede romper el fenómeno de glucotoxicidad y de esta manera se logra restablecer en forma temporal la función de la célula β y lograr nuevamente que se obtenga una respuesta favorable con el uso de sulfonilureas e incluso únicamente con dieta (100). La utilización de insulina como monoterapia permite el control adecuado, sin embargo, la propensión a causar sobreinsulinización, es manifiesta. Aún no se cuentan con estudios adecuados para determinar el efecto a largo plazo de éste fenómeno, sobre la morbi-mortalidad en pacientes con DM-2. Se ha descrito que la hiperinsulinemia acelera la aparición de aterosclerosis, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, hiperuricemia y disminución en las concentraciones de colesterol-HDL (101-103), aunque en publicaciones recientes se menciona únicamente como un marcador de estas patologías y no como factor

patogénico. Se ha incluido en el armamentario terapéutico el uso de acarbose, un inhibidor de la α -glucosidasa. Se ha utilizado como monoterapia o en conjunción a sulfonilureas (104), observándose un efecto benéfico en el control glucémico, más evidente cuando se administra en la última forma descrita.

JUSTIFICACIÓN

La DM-2 se ha asociado a un riesgo aproximadamente 3 veces mayor a la población general, para desarrollar enfermedades cardiovasculares (29) y una reducción sustancial en la esperanza de vida (30). En personas mayores de 40 años, se observa el doble de mortalidad comparada con grupos controles (31). Es la principal causa de ceguera, falla renal y amputaciones, lo cual requiere una gran inversión de recursos. En DM-1, se demostró en el estudio de complicaciones crónicas de la diabetes mellitus (DCCT), que el control estricto de la glucosa produce una disminución en la aparición o progresión de estas complicaciones, sin embargo, a pesar del control adecuado de la glucosa, un número importante de pacientes, desarrollaron las complicaciones. Esto sugiere que pueden existir elementos independientes del control de la glucosa plasmática que pueden determinar la aparición de las complicaciones crónicas. La alta incidencia de complicaciones en pacientes con esta enfermedad, indica que el abordaje terapéutico actual es inadecuado para mantener la salud. No se sabe si el tratamiento se aplica en forma laxa, al mantener la variable de control glucémico muy alta, o si algún tipo de tratamiento tiene ventajas sobre los otros. Se están efectuando estudios prospectivos con el fin de analizar que tipo de terapéutica es útil para prevenir la aparición de complicaciones. Hasta que no pueda establecerse, mucho del cuidado que se administra actualmente en clínicas de diabetes y de atención general, no se encuentra dirigido sobre bases firmes. El estudio de diabetes del Reino Unido, informó de los resultados obtenidos en el análisis de estas variables. Lo que parece evidente en la actualidad, es que el buen control glucémico se asocia a una tasa de supervivencia mayor (32).

Las mezclas de biguanidas y sulfonilureas tienen un efecto benéfico sobre el control de las concentraciones de glucosa en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Pueden utilizarse dosis menores de cada uno de los fármacos, lo que puede disminuir la aparición de efectos indeseables. Sin embargo, existen pocos estudios que analicen el efecto de este tratamiento sobre la secreción de insulina y sobre la sensibilidad a la misma en este grupo de pacientes. Estos han sido longitudinales, donde debido a la variabilidad interindividual tan amplia que presenta este padecimiento en cuanto a fisiopatología se refiere, no es posible establecer conclusiones acerca de cual de estos es el que produce un efecto mas adecuado. Además, se desconoce la respuesta que se obtuvo de acuerdo con el índice de masa corporal o el peso, parámetros que se han utilizado como base para determinar el tipo de hipoglucemante oral que debe ser administrado, ya que

el sustrato fisiopatológico en pacientes obesos y delgados puede ser diferente. Por otro lado, mas del 60% de los pacientes tratados con monoterapia no tuvieron una respuesta adecuada, por lo que fueron tratados con mezcla, con una duración incierta y desconociéndose el efecto de los tratamientos previos. Por lo anterior, consideramos que es indispensable conocer cuales son las alteraciones fisiopatológicas principales en sujetos con DM-2 y sobrepeso y establecer cual es el efecto del tratamiento con glibenclamida, metformín y la mezcla de ambos medicamentos, sobre la secreción de insulina y sobre la sensibilidad a la misma en el mismo paciente, para determinar si alguno de estos tratamientos ofrece alguna ventaja para el manejo de esta patología.

HIPÓTESIS

La mezcla de glibenclamida y metformín es mas útil para alcanzar el control glucémico adecuado que la monoterapia con glibenclamida o metformín en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y sobrepeso.

La bigunida potencia el efecto estimulante sobre la secreción de insulina que produce la sulfonilurea, y la glibenclamida potencia el efecto de disminución de la resistencia a la insulina inducido por el metformin.

OBJETIVOS

Primarios:

- * Establecer el grado de control glucémico que se puede conseguir en pacientes con DM-2 y sobrepeso en condiciones de dieta sin cambios y con el fin de mantener el peso habitual, con el tratamiento con glibenclamida, metformín y mezcla de glibenclamida/metformín.

- * Analizar el efecto de estos tres tratamientos sobre la secreción de insulina.

Este parámetro se determinará mediante la medición en sangre de insulina y péptido C durante las pruebas que se describen en material y métodos

- * Conocer de que manera afectan, cualquiera de estos tres tratamientos, la sensibilidad en tejidos periféricos a la insulina.

Este parámetro se determinará mediante la medición de insulina, péptido C, y glucosa durante las pruebas que se describen en material y métodos.

Secundarios:

- Establecer los cambios en el peso corporal que se puedan inducir con cualquiera de estos tratamientos.
- Valorar los cambios en las concentraciones de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol LDL y triglicéridos y en los valores de apoproteína A1 y B que pueden favorecer estos tratamientos.
- Estudiar las variaciones en las concentraciones de ácido láctico y pirúvico que se producen durante cada uno de los tratamientos.
- Observar el porcentaje de pacientes que desarrollen efectos indeseables con cada uno de los tratamientos.
- Establecer las diferencias entre las determinaciones efectuadas a partir del modelo mínimo y las efectuadas durante la curva de tolerancia a la glucosa oral.
- Analizar los cambios que se observen en todas las variables, comparando el grupo de pacientes que alcanzó el control glucémico adecuado contra el grupo de los pacientes que no lo alcanzaron.

MÉTODOS

Estructura del estudio.

Se trató de un estudio experimental, cruzado, doble ciego, al azar, prospectivo, y dividido en siete fases, siendo la primera la fase de reclutamiento de los pacientes de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión que se explicarán mas adelante. La razón de hacerlo cruzado, es por la poca disponibilidad de pacientes con estas características; por la naturaleza estable de la enfermedad; y con el fin de probar los tres tipos de tratamientos sobre las variables ya comentadas en el mismo paciente.

Los pacientes que cumplieron con los requisitos de ingreso y que estuvieron de acuerdo en participar en el estudio una vez que lo conocieron, fueron sometidos a una valoración médica, con la realización de una historia clínica y exploración física, además de valoración por medio de exámenes de laboratorio, todo esto con el fin de conocer el estado general de los pacientes y para tener la seguridad de que no presentaban contraindicaciones para poder participar en el estudio. En la fase dos, los pacientes fueron sometidos a un período de 8 semanas en que recibieron una dieta isocalórica y suspendieron cualquier tipo de tratamiento hipoglucemiante que estuvieran recibiendo. Recibieron asesoría por parte de una especialista en nutriología con el fin de establecer el grado de apego a la dieta y de aclarar las dudas al respecto de la misma, cada dos semanas. Se hicieron evaluaciones de apego de acuerdo a recordatorios de dieta de 3 días, dos días entre semana y un día de fin de semana. Se estableció como apego adecuado a cumplir al menos con el 80% de las recomendaciones en cuanto a contenido calórico total. Durante estas visitas, se determinó la concentración de glucosa en suero, con el fin de determinar el grado de control y valorar así, que conducta se debía seguir con cada paciente, es decir, si el paciente fue controlado, si su control fue aceptable, o el descontrol fue lo suficientemente importante como para requerir tratamiento hipoglucemiante (glucosa plasmática mayor de 350 mg/dL) o con insulina en forma urgente (estado hiperosmolar u otro tipo de descontrol agudo).

Los pacientes que permanecieron con un descontrol moderado (glucosa sanguínea > 140 y < 350 mg/dL) y que se encontraban asintomáticos, fueron incluidos en las siguientes fases del estudio, que son tres de tratamiento activo y dos períodos de lavado de medicamentos intercalados entre los períodos de tratamiento. Los pacientes fueron asignados en forma aleatoria a tres grupos diferentes. Cada uno de los grupos recibió los tres tipos de tratamiento (glibenclamida, metformin y la mezcla glibenclamida/metformin) en un orden diferente, también establecido al azar. La

administración de los medicamentos fue de tipo doble ciego por parte de los investigadores del estudio.

Al inicio y al final de cada una de las fases de tratamiento, cuya duración fue de 10 semanas cada una de ellas, los pacientes fueron sometidos a la valoración de la capacidad de secreción de insulina, así como a pruebas de sensibilidad a la insulina.

Estos estudios consistieron en la realización de una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) con el fin de determinar glucosa, insulina y péptido C. Además, se realizó el modelo mínimo de tolerancia a la glucosa intravenosa. De la muestra basal del estudio de tolerancia a la glucosa, se determinó la hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), lactato, piruvato, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y apoproteína A1 y B. Durante cada mes del tratamiento, la valoración por parte de la especialista en nutriología, continuó para la establecer el apego y llevar a cabo los ajustes necesarios. En las revisiones médicas periódicas (cada semana hasta alcanzar la glucosa de ayuno menor a 140 mg/dL o la dosis máxima del tratamiento y cada mes una vez llegado al estado antes mencionado), se recabaron los efectos indeseables que se presentaron. En los períodos de tratamiento siguientes, recibieron el fármaco dependiendo del grupo al que pertenecieron.

Las dosis diaria de glibenclamida, metformín y mezcla que se utilizaron, de acuerdo con las cifras de glucemia obtenidas en la valoración inmediatamente anterior al período de tratamiento, se determinó de acuerdo con el siguiente esquema:

Glucosa en suero	Placebo	Glibenclamida	Metformin	Mezcla	
		Tabletas 5 mg	Tabletas 500 mg	Glibencia 5 mg	Meff 500 mg
> 140 - 180 mg/dL	1	1	1	1	1
> 181 - 220 mg/dl	2	2	2	2	2
> 221 - 260 mg/dl	3	3	3	3	3
> 261 - 300 mg/dl	4	4	4	4	4

Las tabletas de placebo se administraron en igual número al número de tabletas de los medicamentos activos en la fase de monoterapia y el doble en las fases de lavado, así todos los pacientes recibieron al menos dos tabletas diferentes de medicamento o placebo en cualquier fase del estudio, de acuerdo a la concentración de glucosa de ayuno al inicio de dicho período.

A la inclusión de cada paciente en la fase de tratamiento, se sorteó para determinar la secuencia de tratamientos que recibió y de acuerdo a un código, en cada visita determinada para ello, se le proporcionó el medicamento activo o el placebo que

se utilizó en las fases tratamiento y de lavado. Se recibieron después de cada visita, los frasco con las tabletas sobrantes con el fin de establecer el número de tabletas que no fueron consumidas, para establecer así, el grado de apego de cada uno de los pacientes. Al iniciar cada una de las fases, se hizo una valoración semanal de las concentraciones de glucosa, con el fin de llegar a la dosis óptima de cada uno de los tratamientos a la brevedad, posteriormente se hizo una valoración al mes siguiente, con el fin de corroborar que el paciente continuaba controlado o si requirió otro ajuste de dosis. Entre el primer y segundo período de tratamiento y entre éste y el tercero, hubo un período de lavado con una duración de 6 a 12 semanas, en los que los pacientes suspendieron el tratamiento activo y continuaron únicamente con la dieta y un placebo, en la misma cantidad de tabletas que las que recibieron durante el período de tratamiento anterior. Al final del último período de tratamiento, se suspendieron los tratamientos activos y se indicó el tratamiento que más beneficios le haya aportado a cada paciente.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1.- Pacientes con DM-2 que asistieron a la consulta de Diabetes y de Medicina Interna en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- 2.- Edad entre 40 y 80 años, con menos de 10 años de diagnóstico de la enfermedad
- 3.- Índice de masa corporal mayor de 25 y menor de 30 kg/m².
- 4.- Tratados con dieta o con hipoglucemiantes orales.
- 5.- Que no hayan recibido tratamiento con insulina.
- 6.- Glucosa sérica mayor a 140 mg/dL al final de la fase de dieta.
- 7.- Hemoglobina A_{1c} mayor a 7% al final de la fase de dieta.
- 8.- Residentes en la Ciudad de México.
- 9.- Aceptación, por parte del paciente, a participar una vez conocidos los objetivos y el plan de estudio, firmando la hoja de consentimiento informado correspondiente.
- 10.- Sin evidencia de complicaciones crónicas relacionadas a la DM-2.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1.- Evidencia de enfermedades sistémicas graves:
- 2.- Evidencia de enfermedades mortales a corto plazo.

- 3.- Historia de enfermedades graves en los 6 meses previos a la inclusión al estudio.
- 4.- Historia de hospitalizaciones mayores a 7 días en los 6 meses previos a la inclusión al estudio.
- 5.- Utilización de medicamentos que pudieran influir sobre la tolerancia a la glucosa.
- 6.- Empleo de medicamentos que interfieran con la acción de los compuestos utilizados durante el estudio.
- 7.- Intolerancia conocida a sulfonilureas o biguanidas.
- 8.- Incapacitados para transportarse.
- 9.- Incapacidad para deglutir.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- 1.- Presencia de descontrol grave (glucosa sérica mayor de 350 mg/dL) durante cualquiera de las fases del estudio.
- 2.- Presencia de hipoglucemia (glucosa sérica menor de 70 mg/dL) a dosis mínimas de cada uno de los tratamientos.
- 3.- Presencia de efectos indeseables intolerables con cualquiera de los tratamientos.
- 4.- Apego menor al 80% de la dieta isocalórica.
- 5.- Apego inadecuado al tratamiento médico (que menos del 80% de las tabletas asignadas, hayan sido consumidas).
- 6.- Falta a dos visitas programadas.
- 7.- No completar con los tres períodos de tratamiento activo.
- 8.- Presencia de alguna enfermedad aguda grave durante el período de tratamiento.
- 9.- No deseo de seguir participando.

NÚMERO DE SUJETOS

El cálculo del tamaño de la muestra se hizo utilizando como factor mas importante y el que determinó tanto la inclusión al estudio, como su permanencia en el mismo y el que determinó los ajustes de dosis de los medicamentos, al control glucémico.

Utilizando la fórmula:

$$N = 2(\sigma/\delta)^2 (t_1+t_2)^2$$

Se consideró un error $\alpha = 0.05$, y un error $\beta = 0.1$. La diferencia mínima detectable es de 66 mg/dL, con una desviación estándar de 63 mg/dL, la $n = 10$ sujetos por grupo. Ya que se trata de un diseño de muestras repetidas, se requirió que al menos 10 pacientes concluyeran con los 3 tipos de tratamiento. Se esperaba una pérdida de 20% de los pacientes, por lo que se incluyeron a las fases de tratamiento 12 pacientes. En la fase de reclutamiento se incluyeron mas pacientes, ya que la literatura informa que entre el 14 y 18% de los pacientes se controlan durante la fase de dieta isocalórica.

DESCRIPCIÓN DE LA EVALUACIÓN METABÓLICA

A todos los pacientes que se incluyeron en las fases de tratamiento activo, al inicio y al final de las mismas, se les practicaron los siguientes procedimientos para evaluar la secreción de insulina y la sensibilidad a la misma:

1.- Curva de tolerancia a la glucosa oral.

Después de un ayuno de al menos 8 horas y no mayor de 12 horas, entre las 7:00 y 8:00 horas del día, los pacientes acudieron al servicio de toma de muestras de la Clínica de Diabetes y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, donde se llevó a cabo el estudio.

Se tomó una muestra de 5.0 ml de sangre total para la determinación de glucosa, insulina y péptido C. La glucosa se midió el mismo día, el resto de las mediciones se hicieron posteriormente, por lo que el suero obtenido de dicha muestra y las subsecuentes se almacenó a una temperatura de $< 70^{\circ}$ C hasta que se hizo la determinación (105).

Posteriormente se administró una solución de 75 gramos de glucosa por vía oral, a tomar en 5 minutos. Después de esto, se tomaron 5 ml de sangre en los tiempos 30, 60, 90, 120 y 180 minutos, para hacer las mismas determinaciones mencionadas antes de la ingestión de la glucosa.

En la misma toma de muestra basal, se coleccionará en tubos separados 10 mL mas de sangre para llevar a cabo la determinación de lactato, piruvato, hemoglobina glucosilada A_{1c} , colesterol, triglicéridos, colesterol-HDL, colesterol-LDL, apoproteína A1 y apoproteína B.

De los resultados obtenidos durante esta prueba, se determinó el índice de sensibilidad a la insulina (ISI) por el método de Matsuda (109), con la fórmula:

$$ISI = \frac{10\,000}{\sqrt{(GPA \times IPA) (GP \times IP)}}$$

Donde: GPA = glucosa plasmática de ayuno; IPA = insulina plasmática de ayuno; GP = glucosa promedio de la CTGO; IP= insulina promedio de la CTGO. La glucosa en suero se midió en mg/dL y la insulina en suero en mU/mL.

Además se determinó la relación insulina/glucosa dividiendo el valor de área bajo la curva de insulina sobre el área bajo la curva de glucosa. La relación glucosa/insulina se obtuvo de dividir el área bajo la curva de glucosa entre el área bajo la curva de insulina (106-108).

2.- Modelo mínimo de sensibilidad a la insulina

Después de al menos 8 horas de ayuno, el paciente fue canalizado en una mano, misma que se colocó en una caja a 60° C para arterialización de la sangre venosa, se infundió solución salina al 0.9% para mantener la vía permeable. Una canalización mas se practicó en la vena antecubital contralateral para la inyección de la glucosa. Después de 5 minutos de reposo, se obtuvieron muestras de 3 ml de sangre a los tiempos -15, -5 y 0 minutos y se administró una solución de glucosa a razón de 20 gramos en un período de 3 minutos y se obtuvieron muestras de sangre del mismo volumen indicado a los tiempos 1, 2, 3, 4, 8, 20, 24, 30, 40, 50, 70, 80, 90, 120, y 180 minutos. Al minuto 20, se administró insulina a razón de 0.03 U por Kg de peso corporal, diluida en 5 ml de solución salina, a pasar en 10 minutos mediante bomba de infusión. Se utilizó heparina para poder obtener plasma y hacer las determinaciones de glucosa.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

Todas las muestras fueron determinadas con técnicas estandarizadas en el laboratorio de la Clínica de Diabetes y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, que cuenta con las certificaciones correspondientes.

La glucosa sérica se midió por el método enzimático colorimétrico (GOD-POD), el valor normal se considera entre 70 y 100 mg/dL en ayunas. La Hemoglobina glucosilada A_{1c} fue medida por el método DCA 2000 (Bayer), el valor normal se considera menor de 7 %. La insulina se determinó por radioinmunoensayo específico (INS-PR), el valor normal es

de 7.1 a 15.6 mU/mL en ayunas. El péptido C fue determinado por radioinmunoensayo (C-PEP-PR), el valor normal fue de 0.25 a 0.36 pmol/mL en ayunas.

Para el colesterol se utilizó un método enzimático colorimétrico (SERA-PAK), el valor considerado aceptable es menor de 200 mg/dL en ayunas. Para el colesterol-HDL se precipitó con ácido fosfotúngstico e iones de magnesio, luego se utilizó el método enzimático colorimétrico (SERA-PAK), el valor normal es mayor de 40 mg/dL en hombres y mayor de 50 mg/dL en mujeres, en ambos casos en ayunas. El colesterol-LDL se precipitó con polivulsulfato y en el sobrenadante, se midió también con el método enzimático colorimétrico (SERA-PAK), se consideró normal un valor menor a 100 mg/dL en ayunas. Los triglicéridos se midieron por un método enzimático colorimétrico (SERA-PAK), se consideró un valor normal por debajo de 150 mg/dL, en ayunas. La apoproteína A1 y B se midió por el método de inmunonefelometría, los valores normales son mayores a 105 mg/dL y menores a 115 mg/dL, respectivamente. El ácido láctico y ácido pirúvico se determinaron por métodos enzimáticos con autoanalizador, los valores considerados normales fueron 15.0 mg/dL y 1.5 mg/dL, respectivamente.

ANÁLISIS DE DATOS

El nivel de error alfa fue de 0.05 y el poder que esperamos obtener, fue del 90% (beta 0.1). La hipótesis nula indicaba que no habría diferencia entre el control de la glucosa, la secreción de insulina, la sensibilidad a la misma, la efectividad de la glucosa, la producción hepática de glucosa y el perfil de lípidos, con cualquiera de los tratamientos que se emplearon. Para demostrar lo anterior, se hizo la comparación entre los valores basales y los posteriores a cada tratamiento, mediante el análisis de varianza de una vía (ANDEVA) en el caso de las variables que tuvieron una distribución normal y de las diferencias entre cada tratamiento con análisis de varianza de muestras repetidas cuando se encontró una distribución normal y la prueba de Friedman en las variables con distribución que no fue normal, estableciendo un valor de p con corrección de Bonferroni menor a 0.01666 para determinar la significancia estadística (se divide el valor de p necesario, es decir 0.05 entre el número de comparaciones a realizar, es decir 3).

Se hicieron curvas de las concentraciones de insulina, péptido C, y glucosa en todas las determinaciones de cada uno de los pacientes. Las áreas bajo la curva (AUC) de glucosa, insulina, y péptido C, se midieron en forma acumulativa por el método de trapecoides. La relación insulina/glucosa se obtuvo de dividir el valor del AUC de insulina

entre el AUC de glucosa. La relación glucosa/insulina se obtuvo de dividir el valor de AUC glucosa entre el AUC insulina.

Se empleo la prueba estadística de t de Student para muestras pareadas para las variables continuas con distribución normal y la prueba de rangos asignados de Wilcoxon cuando la distribución no fue normal, para comparar efectos del tratamiento en el mismo grupo. Se utilizó prueba t de Student para muestras independientes en variables con distribución normal o U de Mann Whitney en variables que no tuvieron distribución normal, para comparar los resultados de acuerdo a si se alcanzó el objetivo de control glucémico. Estas pruebas se utilizaron para comparar las áreas bajo la curva antes mencionadas y los valores de glucosa en ayuno, sensibilidad a la insulina (Si), respuesta aguda de insulina (AIRg), efectividad de la glucosa (Sg), índice de sensibilidad a la insulina (ISI), relación insulina/glucosa (RIG), relación glucosa/insulina (GI), perfil de lípidos, apoproteínas, ácido láctico, ácido pirúvico y HbA_{1c}.

Se utilizó χ^2 para variables categóricas o prueba exacta de Fisher.

El análisis cinético de los datos se hizo aplicando el modelo mínimo para desaparición de la glucosa (109-112). El modelo mínimo propuesto por Bergman (113), genera un índice de sensibilidad a la insulina (Si) que describe el efecto de la insulina para promover la captación de glucosa y para inhibir la producción hepática de glucosa. La secreción de insulina se estima a partir de la respuesta aguda de insulina (AIRg). El modelo mínimo también permite la estimación de la efectividad de la glucosa (Sg), que describe el efecto de la glucosa per se a concentraciones basales de insulina, para normalizar su propia concentración a través de la desaparición. Así, Sg describe la depuración de glucosa a concentraciones basales de glucosa e insulina. Finalmente, la evolución en el tiempo de glucosa R_d por unidad de volumen durante la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa será calculada de acuerdo a la ecuación $[Sg + X(t) c(t)]$, donde $X(t)$ representa la evolución en el tiempo de la acción de la insulina periférica expresada en min^{-1} derivada de este modelo. R_d provee una descripción fisiológica de la habilidad del organismo de depurar glucosa de un almacenaje accesible (glucosa infundida). La tolerancia a la glucosa infundida será determinada de la constante de desaparición de la glucosa (K_d) calculada como la pendiente de la regresión lineal de los cuadrados mínimos, relacionada al logaritmo natural de la concentración de la glucosa al tiempo de las muestras tomadas entre los minutos 10 y 32 (114).

RESULTADOS

De los 20 pacientes evaluados para participar en el estudio, fueron excluidos 3 pacientes por controlarse (glucosa en suero menor a 140 mg/dL) en el período de dieta. Cinco pacientes fueron eliminados, uno de ellos por presentar desprendimiento de retina, otro por descontrol grave durante la primera fase de tratamiento y una paciente por embarazo antes de finalizar el primer tratamiento. Dos pacientes fueron eliminados por falta de apego a las visitas de control.

Se practicaron 36 modelos mínimos y curvas de tolerancia a la glucosa oral basales y un número igual después de los tratamientos. Además, de 72 perfiles de lípidos, lactato y piruvato, la mitad basales y el resto, postratamiento.

En la tabla 1 se muestran las características basales de los 12 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y que finalizaron las 3 fases de tratamiento. Se observa que 7 pacientes son de sexo femenino, ninguno de los participantes presentó enfermedad concomitante o complicación de la diabetes. Todos cursaron con descontrol crónico de la glucosa y el perfil de lípidos fue anormal en la mayor parte de ellos en lo referente a colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos, los otros parámetros se encontraron dentro de los límites normales. Los 12 pacientes fueron asignados en forma aleatoria a cualquiera de las 3 secuencias posibles de tratamiento, de esta manera cada grupo se formó con cuatro individuos.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA (N=12).

Característica	Promedio \pm DE	(Mínimo-Máximo)
Sexo (M/F)		5/7
Edad (años)	56.4 \pm 6.1	(25-85)
Evolución de diabetes (años)	7.1 \pm 2.3	(5-10)
IMC (kg/m ²)	27.6 \pm 3.1	(25.3-29.9)
Enfermedades concurrentes (%)	0	
Glucemia (mg/dL)	215.3 \pm 52.1	(155-280)
HbA _{1c} (%)	10.9 \pm 2.35	(8.3-13.5)
Triglicéridos (mg/dL)	315 \pm 285	(145-662)
Colesterol (mg/dL)	213 \pm 35	(188-286)
Colesterol HDL (mg/dL)	34.6 \pm 8.1	(23-38)
Colesterol LDL (mg/dL)	112 \pm 42	(78-185)
Apoproteína A1 (mg/dL)	119.8 \pm 19.5	(99-155)
Apoproteína B (mg/dL)	115.6 \pm 21.2	(95-149)

Control glucémico:

En la tabla 2 y 3 se muestran los valores de glucosa antes y después de cada tratamiento, considerando en la primera a los períodos en bloque (primer período de tratamiento, segundo período de tratamiento, tercer período de tratamiento, independientemente del tipo de medicamento que recibían en cada período) y en la segunda a las tres secuencias posibles (metformin-glibenclamida-mezcla; glibenclamida-mezcla-metformin; mezcla-metformin-glibenclamida), donde es evidente que no existe diferencia alguna entre los grupos, lo cual nos demuestra la ausencia de un efecto imputable a la secuencia o efecto residual de los tratamientos.

Todos los pacientes al ingresar a una fase de tratamiento, habían regresado ya al estado basal en cuanto a las concentraciones de glucosa, sin embargo, al analizar a posteriori otros parámetros como son los valores de AUC de glucosa, insulina y péptido C; colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL y triglicéridos; Apo A y Apo B; lactato y piruvato; Si, Sg y Airg; R I/G y R G/I, se evidenció que regresaron a los niveles basales, lo cual asegura la comparabilidad y la ausencia de errores sistemáticos en el análisis, que puede ser observada en los estudios que incluyen en el diseño el cruzamiento de los sujetos.

Los cambios en las concentraciones de glucosa al finalizar un período o una secuencia fueron estadísticamente significativos. No lo fueron cuando se compararon entre sí los valores pretratamiento en cada uno de los períodos o secuencias, como tampoco entre las determinaciones después de cada uno de ellos.

TABLA 2. GLUCOSA EN SUERO ANTES Y DESPUÉS DE CADA PERÍODO DE TRATAMIENTO (N=12 EN CADA PERÍODO). PROMEDIO ± DE.

Período	Glucosa Pretratamiento (mg/dL)	Glucosa Postratamiento (mg/dL)	p**
1	212.6 ± 51	156.3 ± 49	< 0.01
2	204.1 ± 59 [†]	157.0 ± 35	< 0.05
3	234.8 ± 70 [†]	144.7 ± 56	< 0.01
p*	< 0.01	N.S.	

ANDEVA de muestras repetidas para diferencia de glucosa, p < 0.01.

*ANDEVA de una vía de glucosas pretratamiento y glucosas postratamiento

** t de Student para muestras pareadas por período (pretratamiento vs postratamiento)

[†]p < 0.05 período 2 vs período 3. t de Student para muestras pareadas. Resto de los períodos, N.S.

TABLA 3. GLUCOSA EN SUERO ANTES Y DESPUÉS DE CADA SECUENCIA DE TRATAMIENTO (N=4 EN CADA SECUENCIA). PROMEDIO ± DE.

Secuencia	Glucosa Pretratamiento (mg/dL)	Glucosa Postratamiento (mg/dL)	p**
1	218.9 ± 57	150.3 ± 54	< 0.01
2	214.9 ± 53	153.2 ± 40	< 0.01
3	217.0 ± 58	172.5 ± 51	< 0.05
p*	N.S.	N.S.	

ANDEVA de muestras repetidas para diferencia de glucosa, p < 0.01.

*ANDEVA de una vía para glucosas pretratamiento y glucosas postratamiento.

** t de Student para muestras pareadas por período (pretratamiento vs postratamiento)

Diferencias entre secuencias pretratamiento y entre secuencias postratamiento, t de Student para muestras pareadas, todas las secuencias N.S.

Control glucémico por tratamiento:

Cuando se analizaron los 36 períodos de tratamiento, se observa que el grupo total en promedio no alcanzó el objetivo de control (tabla 4), aunque el cambio presenta valor estadístico. Cuando se comparan los resultados de acuerdo al control obtenido, las diferencias son aún mayores (p < 0.01).

En la tabla 5 se observa el promedio de la glucosa sérica antes y después de cada uno de los tratamientos, de acuerdo al medicamento que se utilizó, donde resulta evidente el mejor control que se logró con la utilización de la mezcla en comparación con los otros dos grupos. Las diferencias fueron estadísticamente significativas (p < 0.05 y < 0.01, respectivamente).

Por ANDEVA se encontró diferencia estadística entre los valores basales de glucosa, a expensas de mayor glucosa en el grupo tratado con metformín/glibenclamida (p < 0.01). Por el mismo análisis, se encontró diferencia entre los valores postratamiento en los grupos de glibenclamida y de mezcla, la diferencia fue mayor, al comparar a la mezcla con el metformín.

TABLA 4. A. GLUCOSA EN SUERO ANTES Y DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS (N=36).

B. GLUCOSA EN SUERO ANTES Y DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS DE ACUERDO AL CONTROL (N=16) Y DESCONTROL (N=20). PROMEDIO ± DE.

	Glucosa Pretratamiento (mg/dL)	Glucosa Postratamiento (mg/dL)	p*
A Total (n= 36)	220.4 ± 58.3	156.6 ± 49.1	< 0.01
B Control (n= 16)	221.7 ± 71.5	112.2 ± 20.8	< 0.01
Descontrol (n= 20)	217.5 ± 61.0	185.0 ± 49.8	< 0.01
p**	N.S.	p < 0.01	

*Prueba t de Student para muestras pareadas. **Prueba t para muestras independientes.

TABLA 5. GLUCOSA EN SUERO ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNO DE LOS MEDICAMENTOS (N=12 EN CADA TRATAMIENTO). PROMEDIO ± DE.

	Glucosa Pretratamiento (mg/dL)	Glucosa Postratamiento (mg/dL)	Diferencia (mg/dL)	p**
Metformín	215.4 ± 58	182.2 ± 49^f	33.1 ± 42	< 0.05
Glibenclamida	208.1 ± 57	159.2 ± 63	48.9 ± 45	< 0.01
Mezcla	237.8 ± 67	129.5 ± 40^f	108.2 ± 68	< 0.01
p*	< 0.01	< 0.01	< 0.01	

ANDEVA de muestras repetidas para diferencia de glucosa, p < 0.01.

*ANDEVA de una vía entre glucosas pretratamiento y entre glucosas postratamiento

** t de Student para muestras pareadas por tratamiento.

^f t de Student para muestras pareadas Metformín vs Mezcla p < 0.05. Resto N.S.

Insulina en suero

En la tabla 6 se señalan los valores de insulina basal antes y después de cada tipo de tratamiento, se observa que los valores basales son muy similares, con cambios en los valores posteriores al tratamiento del 42% para metformín, 53% para glibenclamida y 56% para la mezcla de metformín y glibenclamida. Por la prueba de Friedman no hubo diferencias entre los valores basales como tampoco entre los valores postratamiento.

Al analizar el grado de control obtenido, se observa que el grupo de pacientes con glucosa menor a 140 mg/dL después de algún tratamiento, presentó niveles discretamente menores en el estado basal que el grupo que no alcanzó el control. El incremento después del tratamiento fue menor en los no controlados.

La relación insulina/glucosa de ayunas, mostró para metformín un valor de 0.054 ± 0.021 antes del tratamiento y 0.091 ± 0.034 después del mismo. Para glibenclamida, se encontró un incremento desde 0.054 ± 0.031 antes del tratamiento a 0.108 ± 0.052 después de este. Para mezcla de glibenclamida/metformín, se obtuvo un valor basal de 0.049 ± 0.018 , el cual incrementó a 0.143 ± 0.07 al terminar el tratamiento. Esta diferencia para mezcla es estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Los pacientes que alcanzaron el objetivo de control mostraron una relación insulina/glucosa de ayunas de 0.040 ± 0.015 antes de los tratamientos, con 0.116 ± 0.074 después de los mismos, mientras que los pacientes que no lo alcanzaron, mostraron previo al tratamiento una relación de 0.053 ± 0.036 y de 0.076 ± 0.041 después de los mismos. La diferencia entre los controlados y los no controlados fue estadísticamente significativa, $p < 0.05$.

TABLA 6. INSULINA EN SUERO ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNO DE LOS MEDICAMENTOS (N=12 EN CADA TRATAMIENTO). MEDIANA (RANGO).

	Insulina Pretratamiento (mU/mL)	Insulina Postratamiento (mU/mL)	Diferencia (mU/mL)	p***
Metformín	11.05 (4.21-25.33)	16.85 (8.12-33.98)	5.0 (7.2-13.1)	N.S.
Glibenclamida	10.90 (5.41-27.82)	18.14 (7.65-32.45)	6.2 (2.1-14.5)	N.S.
Mezcla	12.33 (3.12-33.18)	18.81 (9.15-39.2)	6.8 (3.5-16.8)	N.S.
p*	N.S.	N.S.	N.S.	
Control	9.25 (3.12-15.1)	13.33 (7.65-39.2)	3.7 (2.3-16.8)	N.S.
Descontrol	12.15 (6.21-33.18)	14.25 (8.12-31.15)	2.4 (2.1-10.9)	N.S.
p**	N.S.	N.S.	N.S.	

Prueba de Friedman para diferencia de insulina, no significativo.

*Prueba de Friedman entre insulinas pretratamiento y entre insulinas postratamiento.

** Prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes entre control y descontrol.

***Prueba de rangos asignados de Wilcoxon para muestras pareadas, pretratamiento vs postratamiento.

Número de pacientes que alcanzaron el control aceptable:

En la tabla 7 se muestra el total de pacientes que alcanzaron el objetivo de control con cada medicamento en particular, y resulta evidente el mayor efecto de la combinación de sulfonilurea con biguanida para alcanzar un valor menor a 140 mg/dL de glucosa sérica. La diferencia entre los grupos tuvo un valor de $p < 0.01$.

Tomando el valor definido en este estudio, de los 12 pacientes estudiados, cuando recibieron metformín, se observó que tan sólo el 8.3% alcanzaron el objetivo de control, mientras que con glibenclamida fue el 41.6% y con la mezcla el 83%. Tomando el valor aceptado en la actualidad, 8.3% con metformín, 33% con glibenclamida y 41.6% con mezcla de glibenclamida metformín. Utilizando el valor de HbA_{1c} menor a 8%, 0% con metformín, 33% con glibenclamida y 41.6% con mezcla. Con valor menor al 7%, 0% con metformín, 0% con glibenclamida y 25% con metformín/glibenclamida. En los pacientes que se controlaron de acuerdo a la cifra de glucosa, encontramos que el 56% alcanzaron el objetivo de HbA_{1c} menor a 8%, 18% con valores menores al 7%. En el grupo que no alcanzó el objetivo de control de glucosa de ayuno, no se observó que algún paciente presentara cifras de HbA_{1c}, menores a 9%.

TABLA 7. NÚMERO DE PACIENTES QUE LOGRARON EL OBJETIVO DE CONTROL CON CADA TRATAMIENTO (N=12 CON CADA TRATAMIENTO).

	Metformín	Glibenclamida	Mezcla	p*
Número	1	5	10	< 0.01
Porcentaje	8	41	83	

*Prueba exacta de Fisher.

Peso corporal:

El peso no cambió en forma importante con cada tratamiento. En el grupo de glibenclamida se observó un aumento que no tuvo valor clínico. Cuando se analizó el peso de acuerdo al grado de control conseguido, no se observó algún cambio importante, aunque es de llamar la atención que los pacientes que se controlaron presentaron un peso mayor al inicio (75.1 ± 14 Kg vs 71.3 ± 15 Kg, con un valor de $p < 0.05$). El grupo con descontrol tuvo un incremento que no fue clínicamente significativo.

Eventos Adversos

No se observó efecto adverso alguno imputable a cualquiera de los tratamientos. Únicamente se observó un caso de hipoglucemia leve sintomática y otra asintomática durante la evaluación metabólica (modelo mínimo).

Modelo mínimo:

En la tabla 8 se muestran los valores obtenidos durante el modelo mínimo en cuanto a sensibilidad a la insulina (Si), respuesta aguda de insulina (AIRg) y efectividad de la glucosa (Sg). Por ANDEVA no se encontró diferencia estadística en Si, donde es evidente que todos los pacientes mostraron sensibilidad anormal en el estado basal y que esta no corrigió, salvo en el grupo tratado con glibenclamida, donde por otro lado, no llegó a valores cercanos a lo normal, aunque sí tuvo valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Los valores postratamiento fueron similares en los tres grupos. En el análisis de los valores basales, hubo diferencia del Si entre glibenclamida y la mezcla. En cuanto al valor de AIRg basal, por ANDEVA no se encontró diferencia en el grupo. En cuanto a las diferencias por el tratamiento, esto no fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$), aunque fue evidente un cambio a expensas del aumento observado en glibenclamida y metformín/glibenclamida. En los valores postratamiento también se observó diferencia estadística que dependió del cambio en el AIRg entre metformín y glibenclamida y entre metformín y la mezcla ($p < 0.05$). Sg mostró un decremento en los tres grupos, no significativo. Cuando se analizan estos mismos parámetros de acuerdo al grado de control obtenido, se muestra que los valores basales no son diferentes y se observó un mayor cambio en los grupos que lograron control en cuanto a Si y AIRg (tabla 9). En este último, se observó un cambio significativo en el grupo controlado y menor en el no-controlado. Sg mostró también un decremento en los 2 grupos.

TABLA 8.- VALORES DE SENSIBILIDAD A LA INSULINA (Si), RESPUESTA AGUDA DE INSULINA (AIRg) Y EFECTIVIDAD DE LA GLUCOSA (Sg), ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS. PROMEDIO ± DE.

	Metformín		Glibenclamida		Mezcla	
	pre	post	pre	post	pre	post
Si	1.38 ± 1.05	1.41 ± 1.29	0.90 ± 0.80'	1.70 ± 0.99	1.83 ± 1.23'	1.78 ± 1.02
p*	N.S.		p < 0.05		N.S.	
AIRg	89.2 ± 58	94.4 ± 47[†]	86.4 ± 58	130.9 ± 71[†]	70.5 ± 47	132.7 ± 63[†]
p*	N.S.		p < 0.05		p < 0.01	
Sg	0.012 ± 0.003	0.011 ± 0.004	0.023 ± 0.003	0.014 ± 0.008	0.030 ± 0.05	0.017 ± 0.002
p*	N.S.		N.S.		N.S.	

* Prueba t de Student para muestras pareadas, pre vs post.

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de Si, no significativo.

ANDEVA de una vía entre Si pretratamiento y entre Si postratamiento, no significativo.

†Diferencia entre Si del grupo glibenclamida y mezcla, p < 0.05. Prueba t de Student para muestras pareadas.

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de AIRg, p < 0.05.

ANDEVA de una vía para AIRg pretratamiento, no significativo.

ANDEVA de una vía para AIRg postratamiento, p < 0.01.

†Diferencia entre AIRg del grupo glibenclamida y metformín y entre mezcla y metformín p < 0.05, prueba t de Student para muestras pareadas.

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de Sg, no significativo.

ANDEVA de una vía entre Sg pretratamiento y entre Sg postratamiento, no significativo.

TABLA 9.- VALORES DE SENSIBILIDAD A LA INSULINA (Si), RESPUESTA AGUDA DE INSULINA (AIRg) Y EFECTIVIDAD DE LA GLUCOSA (Sg), DE ACUERDO AL GRADO DE CONTROL OBTENIDO. PROMEDIO ± DE.

	Control (n= 16)		Descontrol (n= 20)		p*	
	pre	post	pre	post	Pre vs pre	Post vs post
Si	1.33 ± 1.11	1.82 ± 0.93	1.40 ± 1.08	1.48 ± 1.20	N.S.	N.S.
p*	N.S.		N.S.			
AIRg	75.5 ± 50	140.5 ± 69	86.0 ± 67	109.1 ± 52	N.S.	< 0.05
p*	p < 0.01		N.S.			
Sg	0.028 ± 0.004	0.019 ± 0.002	0.016 ± 0.001	0.010 ± 0.006	N.S.	N.S.
p*	N.S.		N.S.			

* Prueba t de Student para muestras independientes.

Area bajo la curva de tolerancia a la glucosa oral:

En la tabla 10 se observan los valores de área bajo la curva de glucosa (AUCg) y de insulina (AUCi), donde los cambios son importantes en los tres grupos comparados con sus valores basales respectivos. El cambio mayor se observó en el grupo de mezcla en cuanto a la AUCg y en el de mezcla y glibenclamida en cuanto a la AUCi. Los cambios en el grupo de mezcla en cuanto a AUCg y AUCi son estadísticamente significativos ($p < 0.01$). El grupo con glibenclamida mostró cambios en AUCi significativos. El grupo con metformín, aunque mostró cambios, estos fueron pequeños y no significativos. Por ANDEVA no se observó diferencia entre los valores basales, pero sí en los valores postratamiento. Por ANDEVA para muestras repetidas se observó valor estadístico en las diferencias entre los valores basales y los posteriores al tratamiento. Los cambios son mayores cuando se analizan de acuerdo al control conseguido en ambos parámetros. Hay decremento de AUCg y aumento de AUCi con el control (figura 1 y 2) y sólo en AUCi en el grupo con descontrol. En el área bajo la curva de péptido C (AUCpc), se observa un incremento en todos los grupos, pero no hay diferencia importante entre cada uno de ellos.

TABLA 10.- VALORES DE ÁREA BAJO LA CURVA DE GLUCOSA (AUCg), ÁREA BAJO LA CURVA DE INSULINA (AUCi), ÁREA BAJO LA CURVA DE PÉPTIDO C (AUCpc) ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS (N= 12 CON CADA TRATAMIENTO). PROMEDIO \pm DE.

	Metformín		Glibenclamida		Mezcla	
	pre	post	pre	post	pre	post
AUCg	57312 \pm 8791	51473 \pm 9873	55146 \pm 11131	49803 \pm 14046	60745 \pm 8429	41958 \pm 7931
p*	N.S.		N.S.		< 0.01	
AUCi	3777 \pm 3007	5082 \pm 3416	3633 \pm 2372	6378 \pm 3995	3665 \pm 2528	6265 \pm 3670
p*	N.S.		< 0.01		< 0.01	
AUCpc	126.7 \pm 63.9	187.2 \pm 148	146.2 \pm 101.4	179.5 \pm 148	139.7 \pm 96.8	158.5 \pm 116
p*	N.S.		N.S.		N.S.	

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de AUCg, $p < 0.01$

ANDEVA de una vía entre AUCg pretratamiento y entre AUCg postratamiento no significativo.

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de AUCi, no significativo.

ANDEVA de una vía entre AUCi pretratamiento, no significativo.

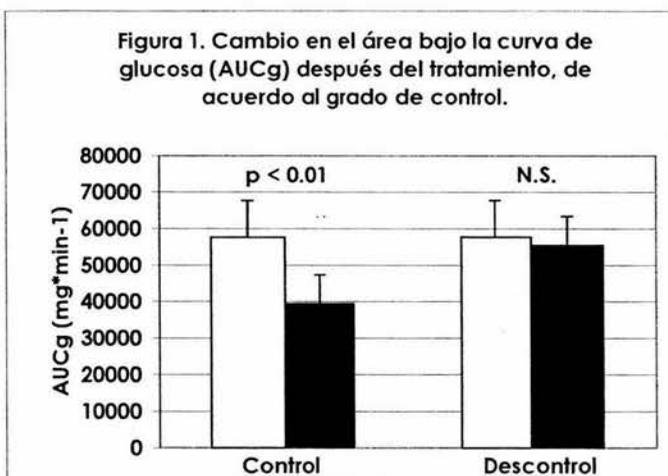
ANDEVA de una vía para AUCi postratamiento, $p < 0.01$.

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de AUCpc, no significativo.

ANDEVA de una vía entre AUCpc pretratamiento y entre AUCpc postratamiento, no significativo.

* Prueba t para muestras pareadas. Pretratamiento vs postratamiento

Figura 1. Cambio en el área bajo la curva de glucosa (AUCg) después del tratamiento, de acuerdo al grado de control.

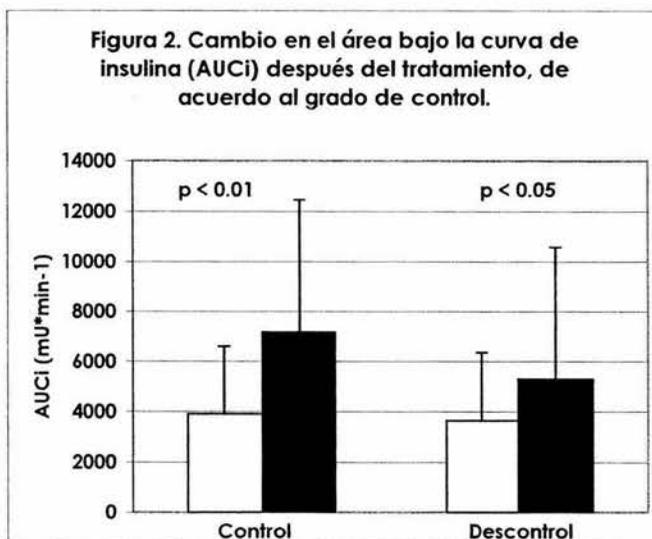


Promedio \pm DE. Prueba t para muestras independientes.

Control pretratamiento \square vs. Descontrol pretratamiento \square , N.S.

Control postratamiento \blacksquare vs. Descontrol postratamiento \blacksquare , p < 0.01

Figura 2. Cambio en el área bajo la curva de insulina (AUCi) después del tratamiento, de acuerdo al grado de control.



Promedio \pm DE. Prueba t para muestras independientes.

Control pretratamiento \square vs. Descontrol pretratamiento \square , p N.S.

Control postratamiento \blacksquare vs. Descontrol postratamiento \blacksquare , p N.S.

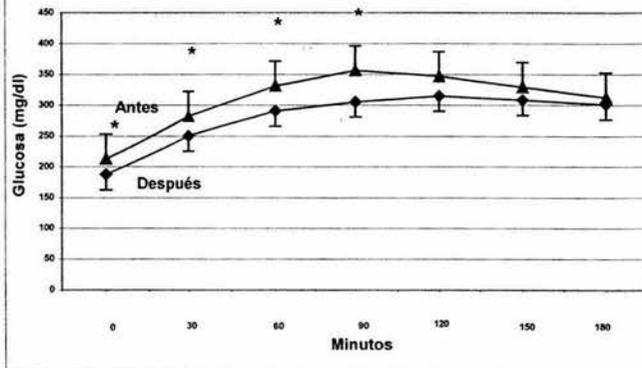
Curva de glucosa e insulina antes y después de los tratamientos:

En las figura 3 a 8 se muestran los valores promedio de glucosa e insulina obtenidos durante las curvas de tolerancia a la glucosa oral con cada tratamiento. No hubo diferencia estadística entre los valores del AUCg basal entre los 3 grupos, como tampoco en el AUCi de los mismos. Los valores postratamiento de las AUCg si mostraron diferencias estadísticas por ANDEVA. De lo anterior, se hace evidente que la disminución de las cifras de glucosa durante la curva de tolerancia a la glucosa oral está en relación con cambios en los valores de insulina.

En la figura 3 y 4 se muestra las diferencias en los valores de glucosa e insulina antes y después del tratamiento con metformín, donde se observa diferencias importantes entre los valores de glucosa e insulina durante las curvas. En la figura 5 y 6 se muestra la relación de estos parámetros en el grupo de glibenclamida, donde se observan diferencias aún mayores. En la figura 7 y 8 se muestran las diferencias para el grupo cuando recibió la mezcla, donde las mismas, en todos los tiempos son aún mayores ($p < 0.01$).

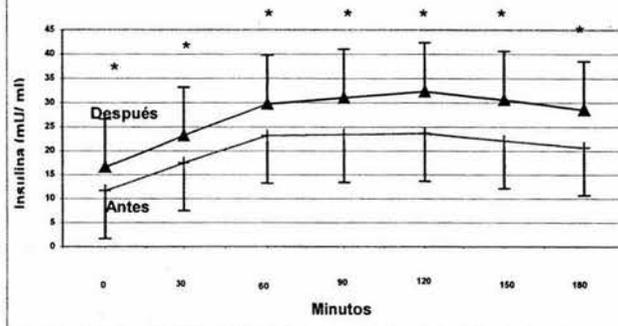
En el caso de las curvas de glucosa es evidente que todas las curvas posteriores al tratamiento son menores a las curvas sin tratamiento. En el caso de la insulina se observa que el cambio consiste en el aumento de las curvas postratamiento comparadas con las pretratamiento.

Figura 3. Valores de glucosa en suero durante la curva de tolerancia a la glucosa oral antes y después del tratamiento con mefformín (n=12). Promedio \pm DE.



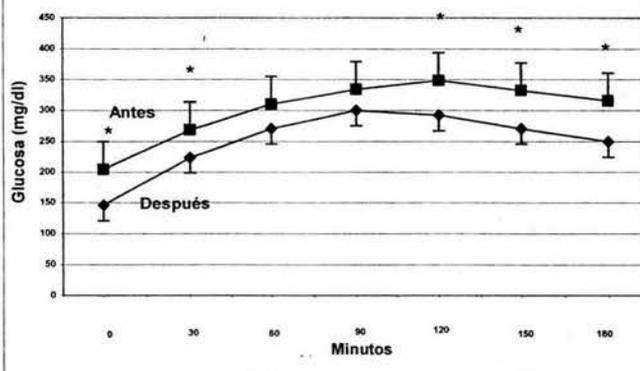
* $p < 0.05$, Prueba t para muestras pareadas.

Figura 4. Valores de insulina en suero durante la curva de tolerancia a la glucosa oral antes y después del tratamiento con mefformín (n=12). Promedio \pm DE.



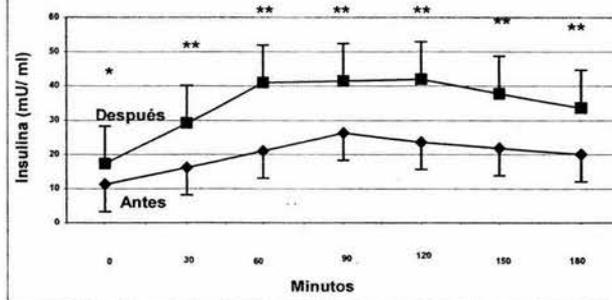
* $p < 0.05$, Prueba t para muestras pareadas.

Figura 5. Valores de glucosa en suero durante la curva de tolerancia a la glucosa oral antes y después del tratamiento con glibenclamida (n=12). Promedio \pm DE.



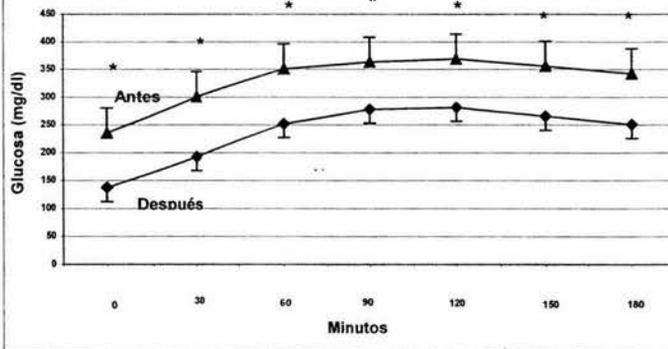
* p < 0.05, Prueba t para muestras pareadas

Figura 6. Valores de insulina en suero durante la curva de tolerancia a la glucosa oral antes y después del tratamiento con glibenclamida (n=12). Promedio \pm DE



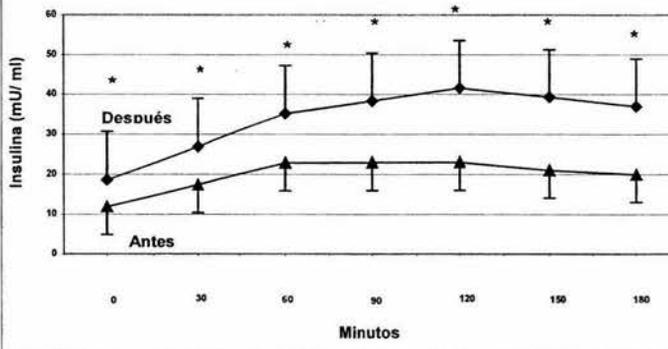
* p < 0.05. ** p < 0.01, Prueba t para muestras pareadas

Figura 7. Valores de glucosa en suero durante la curva de tolerancia a la glucosa oral antes y después del tratamiento con metformín/glibenclámda (n=12). Promedio \pm DE.



*p < 0.01, Prueba t para muestras pareadas.

Figura 8. Valores de insulina en suero durante la curva de tolerancia a la glucosa oral antes y después del tratamiento con Metformín/glibenclámda (n=12). Promedio \pm DE.



* p < 0.01, Prueba t para muestras pareadas.

Valores obtenidos durante la curva de tolerancia a la glucosa oral:

En la tabla 11 se muestran los valores de índice de sensibilidad a la insulina (ISI) obtenidos de la curva de tolerancia a la glucosa oral y en todos los grupos se observó un decremento de este valor. El análisis de varianza demostró que no hubo diferencias entre los grupos en los valores pretratamiento y los valores postratamiento. Se observó un incremento del mismo cuando los pacientes se analizaron de acuerdo al control conseguido con un valor de $p < 0.1$ (tabla 12).

En estas mismas tablas se observan los valores de la relación insulina/glucosa y glucosa/insulina. En cuanto a la relación insulina glucosa, por ANDEVA no se encontraron diferencias entre los valores previos al tratamiento. Tampoco se observó en las diferencias dadas por el tratamiento, aunque sí fue diferente en los valores postratamiento. Es evidente el incremento en la relación en los 3 grupos, siendo mayor en los pacientes que emplearon la mezcla y mayor aún en los pacientes que lograron el control, comparados con los que no lo consiguieron. La relación glucosa/insulina por ANDEVA no mostró diferencias en los valores basales y en las diferencias, pero sí fue evidente en los valores postratamiento. Esta disminuyó en los 3 grupos, en forma más importante en el grupo con la mezcla y también cuando se analizaron los resultados de acuerdo al control obtenido.

TABLA 11.- VALORES DEL ÍNDICE DE SENSIBILIDAD A LA INSULINA (ISI), RELACIÓN INSULINA/GLUCOSA (RIG) Y RELACIÓN GLUCOSA/INSULINA (GI), ANTES Y DESPUÉS DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS. PROMEDIO \pm DE.

	Meformín		Glibenclamida		Mezcla	
	pre	post	pre	post	pre	post
ISI	3.56 \pm 2.56	3.05 \pm 1.97	3.61 \pm 2.18	3.22 \pm 3.84	3.13 \pm 1.75	2.83 \pm 1.59
p*	N.S.		N.S.		N.S.	
RIG	0.070 \pm 0.06	0.101 \pm 0.06	0.070 \pm 0.04	0.140 \pm 0.10	0.065 \pm 0.052	0.153 \pm 0.09
p*	N.S.		< 0.02		< 0.01	
GI	23.3 \pm 13.5	15.37 \pm 10.9	24.5 \pm 20.1	15.11 \pm 19.5	28.0 \pm 24.4	8.84 \pm 4.76
p*	< 0.05		< 0.05		< 0.02	

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de ISI, no significativo.

ANDEVA de una vía entre ISI pretratamiento y entre ISI postratamiento, no significativo.

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de RIG, no significativo.

ANDEVA de una vía entre RIG pretratamiento, no significativo.

ANDEVA de una vía entre RIG postratamiento, $p < 0.01$.

ANDEVA de muestras repetidas para cambio de GI, no significativo.

ANDEVA de una vía para GI pretratamiento, no significativo.

ANDEVA de una vía para GI postratamiento, $p < 0.01$.

TABLA 12.- VALORES DEL ÍNDICE DE SENSIBILIDAD A LA INSULINA (ISI), RELACIÓN INSULINA/GLUCOSA (RIG) Y RELACIÓN GLUCOSA/INSULINA (GI), DE ACUERDO AL GRADO DE CONTROL OBTENIDO. PROMEDIO ± DE.

	Control (n= 16)		Descontrol (n= 20)		p	
	pre	post	pre	post	Pre vs pre	Post vs Post
ISI	3.12 ± 1.75	3.40 ± 3.42	3.64 ± 2.5	2.62 ± 1.49	N.S.	N.S.
p*	N.S.		N.S.			
RIG	0.073 ± 0.052	0.183 ± 0.101	0.072 ± 0.061	0.098 ± 0.061	N.S.	< 0.05
p*	< 0.01		N.S.			
GI	24.41 ± 21.21	7.88 ± 5.27	24.53 ± 19.1	17.09 ± 17.1	N.S.	< 0.05
p*	< 0.02		N.S.			

* Prueba t para muestras independientes.

Hemoglobina glucosilada, perfil de lípidos, lactato y piruvato:

En la tabla 13 se muestran los cambios en la hemoglobina glucosilada, perfil de lípidos, lactato y piruvato antes de cada tratamiento y en la tabla 14, los cambios de acuerdo a si llegaron al valor de control considerado en este estudio. En cuanto a la hemoglobina glucosilada, se observó una tendencia a disminuir con glibenclamida y con la mezcla, esta última tuvo valor estadístico. El colesterol total disminuyó con los tres tratamientos. En el grupo con tratamiento combinado, el cambio fue significativo ($p < 0.05$). En el grupo con glibenclamida se observó la misma tendencia a disminuir, aunque la diferencia no tuvo significado estadístico. El colesterol HDL aumento levemente sólo con el tratamiento combinado. El colesterol LDL disminuyó con metformín y con glibenclamida aunque sin valor estadístico. La mezcla no produjo diferencia alguna. Los niveles de triglicéridos mostraron disminución sólo en el grupo tratado con la mezcla, lo cual tampoco representó significado estadístico. Los niveles de apoproteínas A1 y B mostraron pocos cambios con respecto a los valores basales. Lactato no mostró cambios de consideración como tampoco lo hizo el piruvato.

El análisis de varianza no demostró diferencias en los valores basales en todas las mediciones. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas en hemoglobina glucosilada, colesterol total, colesterol LDL, triglicéridos, apoproteína A1, apoproteína B, lactato y piruvato. Los valores postratamiento entre todos los grupos fueron diferentes en hemoglobina glucosilada, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, apoproteína B y lactato.

Cuando se analizaron los resultados de acuerdo a si se consiguió el control o descontrol de la glucosa, el grupo en descontrol mostró un incremento significativo de los valores de Apo A1. En el grupo controlado, se observó diferencia estadística en los niveles de HbA_{1c}, colesterol total, lactato y piruvato. (tabla 14).

TABLA 13. VALORES DE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (HbA_{1c}), COLESTEROL TOTAL (CT), COLESTEROL HDL (CHDL), COLESTEROL LDL (CLDL), TRIGLICÉRIDOS (TG), APOPROTEÍNA A (APO A), APOPROTEÍNA B (APO B), LACTATO Y PIRUVATO, ANTES Y DESPUÉS DE CADA TRATAMIENTO (N=12 CON CADA TRATAMIENTO). PROMEDIO ± DE.

	Metformín		Glibenclamida		Mezcla	
	pre	post	pre	post	pre	post
HbA _{1c} (%)	10.4 ± 2.8	11.0 ± 1.6	10.7 ± 2.2	9.8 ± 1.9	11.4 ± 2.0	9.0 ± 2.1
p*	N.S.		N.S.		< 0.01	
CT(mg/dl)	212 ± 35	207 ± 33	207 ± 36	193 ± 36	214 ± 36	199 ± 26
p*	N.S.		N.S.		< 0.05	
CHDL(mg/dl)	33.5 ± 7.5	31.2 ± 8.0	36.1 ± 9.0	35.2 ± 11.4	36.8 ± 8.9	37.0 ± 9.3
p*	N.S.		N.S.		N.S.	
CLDL(mg/dl)	124 ± 34	113 ± 40	123 ± 50	101 ± 51	129 ± 30	125 ± 28
p*	N.S.		< 0.05		N.S.	
Tg(mg/dl)	267 ± 159	311 ± 188	241 ± 172	282 ± 179	243 ± 174	183 ± 78
p*	N.S.		N.S.		N.S.	
Apo A1(mg/dl)	119.3 ± 19.0	134.5 ± 23.6	118.3 ± 21.8	125.2 ± 24.9	131.7 ± 24.6	139.9 ± 30.9
p*	< 0.01		N.S.		N.S.	
Apo B(mg/dl)	117.9 ± 19.7	124.3 ± 27.6	113.9 ± 23.8	111.7 ± 26.4	113.6 ± 21.9	111.5 ± 26.9
p*	N.S.		N.S.		N.S.	
Lactato(mg/dl)	15.0 ± 6.27	15.0 ± 5.0	15.2 ± 5.0	13.4 ± 3.9	12.2 ± 1.4	11.7 ± 2.2
p*	N.S.		N.S.		N.S.	
Piruvato(mg/dl)	1.07 ± 0.9	0.88 ± 0.5	1.21 ± 0.62	0.94 ± 0.65	0.80 ± 0.76	0.61 ± 0.3
p*	N.S.		N.S.		N.S.	

* Prueba t para muestras pareadas, dos colas.

TABLA 14. VALORES DE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (HbA_{1c}), COLESTEROL TOTAL (CT), COLESTEROL HDL (CHDL), COLESTEROL LDL (CLDL), TRIGLICÉRIDOS (TG), APOPROTEÍNA A (APO A), APOPROTEÍNA B (APO B), LACTATO Y PIRUVATO, ANTES Y DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS DE ACUERDO AL GRADO DE CONTROL CONSEGUIDO. PROMEDIO ± DE.

	Control (n=16)		Descontrol (n= 20)	
	pre	post	pre	post
HbA _{1c} (%)	11.2 ± 2.0	8.6 ± 1.9	11.4 ± 2.3	10.8 ± 1.2
p*	< 0.01		N.S.	
CT(mg/dl)	209 ± 42	192 ± 30	210 ± 27	202 ± 34
p*	< 0.01		N.S.	
CHDL(mg/dl)	36.0 ± 8.6	36.5 ± 9.5	34.2 ± 9.0	32.5 ± 11.6
p*	N.S.		N.S.	
CLDL(mg/dl)	130 ± 34	122 ± 28	122 ± 48	106 ± 58
p*	N.S.		< 0.05	
Tg(mg/dl)	217 ± 175	166 ± 55	267 ± 160	320 ± 222
p*	N.S.		N.S.	
Apo A1(mg/dl)	131.6 ± 22.4	139.0 ± 28.1	115.5 ± 22.8	126.4 ± 30.5
p*	< 0.01		< 0.05	
Apo B(mg/dl)	111.2 ± 26.1	106.1 ± 28.5	116.6 ± 19.1	122.8 ± 23.1
p*	N.S.		N.S.	
Lactato(mg/dl)	12.2 ± 1.6	11.0 ± 1.5	14.2 ± 4.5	14.7 ± 4.0
p*	N.S.		N.S.	
Piruvato(mg/dl)	0.88 ± 0.78	0.56 ± 0.3	0.93 ± 0.68	0.88 ± 0.63
p*	N.S.		N.S.	

* Prueba t para muestras independientes.

DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad con una alta prevalencia que afecta en la actualidad aproximadamente a 15 millones de adultos en los Estados Unidos y casi 8 millones en México (115, 116). En los últimos años se ha observado un incremento en la prevalencia de la diabetes mellitus en la mayor parte de las poblaciones muy probablemente debido al aumento en la sobrepeso de los sujetos afectados por la enfermedad (117). Se han observado pocos cambios en la incidencia de la misma, salvo en algunas poblaciones, donde se ha manifestado con mayor frecuencia en individuos jóvenes (118, 119). Esto se ha relacionado a cambios en los patrones de alimentación y actividad física, además del aumento en la presencia de obesidad. De acuerdo a los criterios utilizados para el diagnóstico, la prevalencia y la incidencia pueden variar, ya que al utilizar el valor de glucosa de ayuno propuesto por la Asociación Americana de Diabetes para el diagnóstico, se han clasificado como individuos normales hasta el 50% de los pacientes que presentan curvas de tolerancia a la glucosa oral anormales (120,121).

La importancia de la diabetes radica en el hecho de que la hiperglucemia crónica induce la aparición de complicaciones que afectan la micro y macrovasculatura. Aunque se ha observado en pacientes con glucosa sérica de ayuno por debajo de los niveles utilizados para el diagnóstico, un incremento en la mortalidad por causas cardiovasculares (122-124), aunque ésta no ha sido una observación constante (125, 126) y algunos autores han propuesto otros parámetros para predecir la aparición de complicaciones como son los niveles de hemoglobina glucosilada (127), la glucosa postprandial (128) o recientemente la variabilidad de la glucosa plasmática de ayuno, la cual se ha considerado como un factor predictor independiente de mortalidad (129).

Las complicaciones vasculares muestran su importancia en el hecho de que la diabetes es una de las 30 enfermedades que mayor mortalidad pueden causar en todo el mundo (130), siendo la primera, la enfermedad cardiovascular de origen isquémico. En los análisis de mortalidad, la diabetes ocupa el lugar 29º como causa de muerte, pero cuando se analiza como un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular (131-134) alcanza el lugar 14º (135), al producir 2.8 millones de muertes en 1990. En los países desarrollados, al hacer la misma corrección, alcanza el segundo lugar. En las predicciones que se han realizado para el período entre 1990 y 2020, la diabetes ocupará uno de los primeros 20 lugares de mortalidad (136), aunque se espera un descenso con respecto a los años analizados hasta el momento.

Corregir los niveles anormales de glucosa sérica debe inducir a la disminución de las complicaciones originadas por la diabetes tipo 2, sin embargo, esto no ha resultado evidente. En el United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), se mostró que la terapia con medicamentos hipoglucemiantes parece disminuir los eventos relacionados a diabetes, aunque no afectó la mortalidad relacionada a la misma o la relacionada a todas las demás causas (137). El mayor efecto se produce al disminuir las alteraciones microvasculares. En pacientes obesos, la terapia con metformín disminuyó los eventos relacionados a diabetes, la mortalidad por la misma y la mortalidad por todas las causas (138). Por otro lado, el análisis de subgrupos de tratamiento, mostró un incremento en la mortalidad en los pacientes tratados con sulfonilurea y metformín, situación que no se comprobó en estudios epidemiológicos y meta-análisis diversos (139). A pesar de la dificultad de llevar a cabo este estudio y lo complejo del mismo, la cantidad de respuestas que se obtuvieron no fueron las que se esperaban y mucha de la información ha resultado contradictoria y difícil de interpretar (140-141).

En el estudio efectuado en el Steno Diabetes Center, se comparó la utilidad de la terapia estándar (cualquier tipo de medicamento hipoglucemiante) con la terapia intensiva, que consistía en la administración de los mismos medicamentos además del apoyo multidisciplinario y tratamiento específico de hipertensión, dislipidemia y microalbuminuria. Se demostró que la intervención multifactorial intensificada en pacientes con diabetes tipo 2 y microalbuminuria, se disminuye la velocidad de progresión a nefropatía, la progresión a retinopatía y a neuropatía autonómica (142).

En el estudio realizado en la Universidad de Kunamoto, donde se administró tratamiento con base en insulina en un esquema convencional comparado con insulina en dosis múltiples en pacientes japoneses con diabetes tipo 2 seguidos durante 8 años en forma prospectiva, se demostró que el control glucémico intensivo retrasa la aparición y la progresión de complicaciones microvasculares principalmente al disminuir la retinopatía, nefropatía y neuropatía (143).

En un estudio realizado en la Universidad de Turín, se evidenció que la diabetes produce un 35% de mortalidad mayor que en sujetos sin diabetes; que éste aumento es a expensas de mayor mortalidad (40%) en pacientes con glucosa sérica mayor a 160 mg/dL, y en los pacientes que además cursan con hipertensión, se observa un incremento del 40% en el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular (144).

De esta manera, existen varios estudios ya concluidos y otros en vías de hacerlo, que han demostrado que el conseguir un control adecuado disminuye la aparición de

complicaciones principalmente microvasculares. Las complicaciones macrovasculares aún no han sido estudiadas en forma adecuada (145-147).

Por otro lado, ha sido difícil comprobar que el control glucémico adecuado mejore la calidad de vida (148-150). Esto puede tener varias causas, entre las que destacan principalmente la falta de tratamientos adecuados, factores dependientes de los pacientes, conductas médicas inconsistentes o por la dificultad de los instrumentos de medición para detectar pequeños cambios en la calidad de vida. Además, a esto se agrega el hecho de que los pacientes con diabetes utilizan de 1.7 a 2 veces más recursos en salud que los no diabéticos, lo cual ha influido en algunos países a evaluar la necesidad de dar mayor apoyo a los pacientes con diabetes, cuando la mejoría que se puede producir en su estado de salud es pobre (151-152).

La información resulta pues, contradictoria, sin embargo, la conducta actual es la de tratar se obtener el control glucémico adecuado mediante la determinación de factores pronósticos de respuesta (153), programas multidisciplinarios (154), utilizando medidas estandarizadas de tratamiento (155-157), métodos de vigilancia más adecuados (158-159), información a la población general para mejorar las condiciones de estos pacientes (160-162), tratamiento de la depresión que afecta a muchos de estos individuos (163), para tratar de evitar el pobre control, que es una característica de los pacientes con diabetes en la mayor parte del mundo (164-165).

Las medidas utilizadas para el control de la diabetes incluyen en forma inicial a la dieta (166) y el ejercicio (167-169), con el objetivo principal de inducir la pérdida de peso que afecta a la mayor parte de los pacientes que padecen diabetes mellitus tipo 2 (170). En la mayoría de los pacientes, en forma inicial, estas medidas pueden ser suficientes para lograr el control. Cuando no lo son, es necesario agregar a las mismas, algún tipo de medicamento. Entre los que habitualmente se utilizan, están las sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinedionas, meglitinidas, inhibidores de alfa-glucosidasa e insulina. En este estudio se empleó al metformín, glibenclamida y la mezcla de metformín y glibenclamida, que son los medicamentos con los que en nuestro país se tiene más experiencia.

Nuestros datos claramente muestran que la combinación glibenclamida/metformín tiene efectos hipoglucemiantes más potentes que los observados con el uso de estos medicamentos en forma separada. El mejor control glucémico se consiguió con dosis menores, un hecho que puede ser importante para disminuir la probabilidad de efectos adversos.

La mayor eficacia de la combinación informada en este estudio, esta de acuerdo a estudios previos (171-172). En el informe del United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), la adición de metformín a los pacientes tratados con una sulfonilurea, disminuyó la glucosa plasmática de ayuno en 10 mg/dL (173). Después de 3 años de tratamiento, el grupo que recibió la mezcla alcanzó una Hb A_{1c} 1,3% menor que el grupo que fue tratado únicamente con glibenclamida. Sin embargo, existen cuestiones metodológicas que pueden limitar las conclusiones de estos estudios. Muchos de ellos utilizaron un diseño paralelo o la combinación fue utilizada sólo en los casos en que la glibenclamida no fue suficiente para alcanzar los objetivos de control glucémico. Como resultado, los grupos de estudio pueden ser heterogéneos y difíciles de comparar (174-175). Además, en los estudios en los que solo los pacientes que no alcanzaron el objetivo de control glucémico durante la monoterapia fueran asignados a recibir la combinación, tienen un sesgo de selección; sólo los casos mas graves serán los que reciban el tratamiento (176).

Nuestro estudio difiere de los otros por la implementación de un diseño cruzado y doble ciego. Este abordaje del problema es una herramienta potente para comparar los efectos de los tratamientos y para determinar el o los mecanismos asociados a estos cambios. Su empleo elimina las posibles diferencias entre los grupos de tratamiento con respecto a las anomalías de base que pueden influenciar en la respuesta al tratamiento. Los problemas potenciales de este diseño son el sesgo por efecto residual y el sesgo por la secuencia empleada. Estos problemas fueron evitados en este informe. Antes de cada período de tratamiento, confirmamos que los parámetros evaluados regresaran a las condiciones basales. Ninguna secuencia mostró diferencias en los valores postratamiento. El efecto residual de los tratamientos previos o los efectos debidos a la secuencia fueron pues, evitados y los tratamientos tuvieron la misma probabilidad de éxito *a priori*.

El objetivo mas importante de este estudio fue el de describir el mecanismo por el cual se presentan los efectos aditivos del tratamiento combinado con metformin y glibenclamida. La combinación parece actuar en los dos aspectos fisiopatológicos mas importantes de la DM-2, es decir, en la resistencia a la insulina y la disminución en la secreción de la misma (177). Nuestros resultados claramente muestran que la sensibilidad a la insulina no se modifica en forma importante empleando la combinación. Esta conclusión está apoyada por la concordancia que se encontró entre los dos métodos utilizados para estimar la sensibilidad a la insulina. Se conoce el hecho que ambos procedimientos tienen una correlación significativa con el clamp euglucémico (178-179).

El incremento de la secreción de insulina fue la explicación para los efectos aditivos de la combinación. La respuesta secretora incrementada de insulina fue demostrada durante el modelo mínimo y durante la curva de tolerancia a la glucosa oral. Estos resultados están de acuerdo con los estudios *in vitro* (180) en los que se observó que la adición de metformín a células β tratadas con glibenclamida incrementó la secreción de insulina mediada por glucosa. Esta acción se observó en forma mas importante en presencia de concentraciones altas de glucosa. En un estudio informado por Lupi, et al, se mostró que en la presencia de metformín, las células β mantienen en forma completa la capacidad de incrementar la respuesta de insulina a la glucosa, aún en presencia de hiperglucemia (181). Parecería ser cierto que el metformín puede incrementar la capacidad de la glibenclamida para aumentar la secreción de insulina, probablemente por varios mecanismos. En estudios en islotes pancreáticos en los que las concentraciones elevadas de ácidos grasos libres se mantienen constantes, el metformín previene el efecto deletéreo de los ácidos grasos libres en la primera fase de secreción de insulina y en la utilización de la glucosa por parte de las células β (182). Estas observaciones sugieren una acción protectora directa en las células β humanas. Este efecto puede estar debido a la reducción de la oxidación de ácidos grasos libre inducida por metformín en las células β (183). Varios grupos han propuesto que el incremento en la oxidación de los ácidos grasos libres puede llevar a la alteración del metabolismo de la glucosa dentro del islote pancreático, principalmente por competencia de sustratos y este mecanismo puede ser una de las posibles explicaciones a la pérdida selectiva de la respuesta a glucosa por parte de las células β (184-185). Sin embargo, estudios *in vivo* utilizando dosis de metformín equivalentes a las utilizadas en humanos son necesarios para confirmar la existencia de estos efectos de la droga sobre las células β . Por otro lado, el metformín parece proteger a la célula β al provocar la disminución de la concentración plasmática de los ácidos grasos libres (186). Además, al disminuir la producción hepática de glucosa, el metformín puede disminuir la glucosa plasmática de ayuno y como resultado de esto, el efecto deletéreo de la hiperglucemia sobre la secreción de insulina. La hiperglucemia favorece la regulación a la baja de los trasportadores de glucosa y disminuye así, la utilización de la glucosa, lo cual es necesario para el movimiento de los gránulos de insulina a través del citoplasma de las células β pancreáticas (187). Estas observaciones tienen diversas implicaciones clínicas. La terapia combinada puede tener mejores resultados si es utilizada en forma temprana en el curso de la DM-2. Esta premisa se basa en el deterioro

progresivo de la función de la célula β , la cual se espera que ocurra después de varios años del desarrollo de la enfermedad (188). Como resultado de esto, la duración de la diabetes juega un papel importante como un modificador de la respuesta a la combinación. Esta observación puede ser relevante para estudios posteriores, especialmente en ensayos con un diseño paralelo y un grupo pequeño de pacientes. En segundo lugar, la función de la célula β puede determinar el lapso de tiempo en el cual la combinación puede ser útil. El tratamiento combinado no será útil en pacientes con una deficiencia grave de insulina. Finalmente, la adición de metformín a otros secretagogos de insulina puede tener también, efectos aditivos. Un estudio a corto plazo que incluyó a 7 pacientes sugiere que el metformín incrementa las acciones hipoglucemiantes del péptido 1 parecido a glucagon (GLP-1), una incretina que disminuye las concentraciones plasmáticas de glucosa por la estimulación de la secreción de insulina (189). Lo mismo es cierto para otros secretagogos de insulina como la exendina 4 o para los inhibidores de la dipeptidilpeptidasa IV.

Los resultados obtenidos durante la fase de tratamiento con metformín están de acuerdo a observaciones previas en las que se demostró que efecto de la droga sobre la sensibilidad a la insulina es pequeño (190). En estudios recientes se sugiere que el mecanismo de acción principal del metformín es la inhibición de la producción hepática de glucosa (191). La limitante de este reporte es que por los métodos utilizados, no fue posible detectar cambios en la producción hepática de glucosa. Este problema puede ser eliminado al utilizar el clamp euglucémico hiperinsulinémico. Sin embargo, la complejidad de este procedimiento lo hace casi imposible de considerar, ya que hubiera requerido de la repetición del mismo en 6 ocasiones, de acuerdo al diseño de este estudio. A pesar de esta limitante, los datos informados aquí proporcionar información nueva a cerca de los posibles mecanismos por los que el metformín, incrementa el efecto hipoglucemiante de la glibenclamida.

Las acciones metabólicas del metformín parecen ser explicadas por un incremento en la actividad de la proteinkinasa activada por AMP (AMPK), que es un regulador importante al nivel celular para el metabolismo de los lípidos y la glucosa (192). La activación de esta enzima, disminuye la actividad de la Acetil CoA carboxilasa, lo cual resulta en un incremento de la oxidación de los ácidos grasos y una disminución en la lipogénesis al nivel del hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. La disminución de la lipogénesis se ha relacionado también a una menor expresión y actividad de SREBP-1 inducida por AMPK. Esta enzima se expresa en las células β , dejando la posibilidad que su

activación module la secreción de insulina. Estudios *in vitro* han mostrado que el efecto de la activación de AMPK es la inhibición de la liberación de insulina a bajas concentraciones plasmáticas de glucosa (193). En consecuencia, la evidencia actual no proporciona un enlace para los efectos sobre la secreción de insulina informada aquí y la activación de AMPK.

Se requiere información adicional sobre los efectos a largo plazo del uso de la combinación de sulfonilureas y biguanidas. Algunos resultados sugieren que su empleo se asocia a un incremento de la mortalidad (194-195). Sin embargo, comparados con los controles, los pacientes que utilizaron la combinación, fueron más jóvenes, con un tiempo mayor de presencia de la DM-2 y con una glucosa plasmática de ayuno más elevada. El incremento de la mortalidad puede ser un efecto del sesgo de selección y no un efecto adverso de los medicamentos. Un análisis *post hoc* del Estudio de Prevención de Infarto con Bezafibrato, sugiere que el tratamiento combinado se asocia a un incremento de 1.53 (IC 95% 1.2-1.96) en la razón de riesgo para todas las causas de mortalidad, aún después de ajustar para diversas posibles variables confusoras (196). Es claro así, que es necesario implementar estudios clínicos controlados y aleatorizados para estudiar los efectos a largo plazo de la combinación de sulfonilureas y metformín.

Uno de los objetivos del estudio fue establecer si existe algún parámetro laboratorial que pudiera predecir la respuesta a los diversos hipoglucemiantes orales. Esto no fue evidente, ya que todas las determinaciones basales fueron similares entre los pacientes que alcanzaron el objetivo de control y los que no lo hicieron. Entre ninguno de los grupos de tratamiento se observó una diferencia que pudiera predecir que pacientes responderían al tratamiento, por lo que con bases bioquímicas, de lo desprendido en este estudio, no es posible establecer cual tratamiento será más efectivo en un paciente en particular.

El perfil de lípidos es anormal en un gran número de pacientes con diabetes mellitus. En nuestro estudio, muchos pacientes presentaron este tipo de anomalía, probablemente magnificada por el efecto del descontrol (197-199). Aunque con el control no se observaron cambios estadísticamente significativos, sí fue evidente la tendencia a que todos estos parámetros mejoraran asociados al control. Es evidente que en los pacientes que presentan cualquier tipo de alteración en el perfil de lípidos, ya sea debidas a la diabetes o por otras complicaciones, las cuales pueden ser factores de riesgo independientes para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, se lleve a cabo

algún tipo de intervención, ya sea dietaria, ejercicio o agentes hipolipemiantes (200-211), con el fin de disminuir el riesgo incrementado que presentan.

Los niveles de lactato y piruvato mostraron disminuciones no significativas en todos los grupos. Los pacientes controlados mostraron disminución no significativa en los dos parámetros, mientras que los no controlados mostraron incremento no significativo de lactato y disminución leve de piruvato. Se ha mencionado que los tratamientos utilizados en este estudio pueden favorecer la aparición del incremento de los niveles de lactato en pacientes con diabetes. Principalmente, la biguanidas han favorecido estos efectos, sin embargo, en el presente estudio, esto no fue evidente y se reconoce en la actualidad que el tratamiento puede favorecer la aparición de esta complicación, si el paciente presenta algún evento que predisponga a la misma. En este estudio no se observó que algún paciente presentara algún tipo de enfermedad concomitante que favoreciera la aparición de acidosis láctica (212).

La comparación de las mediciones realizadas a partir del modelo mínimo y de la curva de tolerancia a la glucosa, muestran valores similares para las variables que miden aproximadamente lo mismo, sin embargo, en la mayor parte de las determinaciones, no se observó una correlación importante. Del análisis de estos datos, se puede obtener que la curva de tolerancia a la glucosa oral permite llevar a cabo una cantidad mayor de cálculos relacionados a la sensibilidad y la secreción de insulina que lo que permite el modelo mínimo. Por otro lado, la simpleza de la curva comparada con una mayor complejidad y un mayor costo del modelo mínimo, parecen favorecer a la primera para su utilización rutinaria en este tipo de estudios, además, de que puede ser utilizada en la clínica con el fin de analizar los efectos de un tratamiento en un paciente en particular .

En conclusión, los datos informados aquí confirman que la combinación glibenclamida/metformín tiene una potencia hipoglucemiante mayor que los efectos observados por el uso aislado de cualquiera de estos medicamentos. Los efectos aditivos sobre la estimulación de la secreción de insulina son la explicación más importante para la mayor eficacia del tratamiento combinado. El incremento en la sensibilidad a la insulina no parece ser un mecanismo por el cual la combinación produce un efecto hipoglucemiante mayor.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Gúlias-Herrero A, Gómez Pérez F.J. Fisiopatología de la Diabetes mellitus no insulina dependiente. En: Tratado de Diabetología. Gómez Pérez F.J, Rull R. J. Primera Edición 1996. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.
- 2.- Oki JC. Dyslipidemias in patients with diabetes: classification and risks and benefits of therapy. *Pharmacotherapy* 1995; 15: 317-37.
- 3.- Bennett PH. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. In: *Joslin's Diabetes Mellitus*. Kahn CR, Weir GC. Lea & Fabiger. Thirteenth edition. 1994; 193-200.
- 4.- National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-57.
- 5.- Warram JH, Rich SS, Krolewski AS. Epidemiology and genetics of diabetes mellitus. In: *Joslin's Diabetes Mellitus*. Kahn CR, Weir GC. Lea & Fabiger. Thirteenth edition. 1994: 201-15.
- 6.- Knowler WC, Pettit DJ, Saad MF, Bennet PH. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Rev* 1990; 6: 1-27.
- 7.- Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. Secretaría de Salud. México 1995.
- 8.- Zimmet PZ. The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. *Diabetes Care* 1995; 18: 1050-64.
- 9.- Porte D, Kahn S. Mechanisms of hyperglycemia in type II diabetes mellitus: Therapeutic implications for sulfonylurea treatment- an update. *Am J Med* 1991; 90 (Sup 6A): 8s-14s.
- 10.- Sacca L, Hendler R, Sherwin RS. Hyperglycemia inhibits glucose production in man independent of changes in gluco regulatory hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 1160-3.
- 11.- Ward WK, Best JD, Halter JB, Porte D. Prolonged infusion of somatostatin with glucagon replacement increases plasma glucose and glucose turnover in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58: 449-53.
- 12.- Ward WK, Beard JC, Halter JB, Pfeiffer MA, Porte D. Pathophysiology of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1984; 7: 491-502.
- 13.- Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, Halter JB, Porte D. Diminished B-cell secretory capacity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1984; 74: 1318-28.
- 14.- Halter JB, Graf RJ, Porte D. Regulation of insulin-secretory responses by plasma glucose levels in man: evidence that hyperglycemia in diabetes compensates for impaired insulin release. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 946-54.

- 15.- Brunzell JD, Robertson RP, Lerner RL, et al. Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42: 222-9.
- 16.- Pfeiffer MA, Halter JB, Porte D. Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am J Med* 1981; 70: 579-88.
- 17.- Olefsky JM, Kolterman OG, Scarlett JA. Insulin action and resistance in obesity and non-insulin-dependent type II diabetes mellitus. *Am J Physiol* 1982; 243: E15-30.
- 18.- Kolterman OG, Gray RS, Griffin J. Receptor and post-receptor defects contribute to the insulin resistance of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1981; 68: 957-69.
- 19.- Revers RR, Fink R, Griffin J, Olefsky JM, Kolterman OG. Influence of hyperglycemia on insulin's in vivo effects in type II diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1984; 73: 664-72.
- 20.- Bogardus C, Lillioja S, Howard W, Reaven G, Mott D. Relationships between insulin secretion, insulin action and fasting plasma glucose concentration in non-diabetic and non-insulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest* 1984; 74: 1238-46.
- 21.- Best JD, Judzewitsh RG, Pfeiffer MA, et al. The effect of chronic sulfonylurea therapy on hepatic glucose production in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1982; 31: 333-8.
- 22.- Kolterman OG, Gray RS, Shapiro G, et al. The acute and chronic effects of sulfonylurea therapy in type II diabetic subjects. *Diabetes* 1984; 33: 346-54.
- 23.- Simonson DC, Ferrannini E, Bevilacqua S, et al. Mechanism of improvement in glucose metabolism after chronic glyburide therapy. *Diabetes* 1984; 33: 838-45.
- 24.- Bogardus C, Ravussin E, Robbins DC, et al. Effects of physical training and diet therapy on carbohydrate metabolism in patients with glucose intolerance and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1984; 33: 311-8.
- 25.- Ferrannini E, Barret EJ, et al. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 1983; 72: 1737-47.
- 26.- Hollander PM, Asplin CM, Palmer JP. Glucose modulation of insulin and glucagon secretion in non-diabetic and diabetic men. *Diabetes* 1982; 31: 489-95.
- 27.- Weir GC. The relationship of diabetes, loss of glucose-induced insulin secretion, and GLUT 2. *J Diab Comp* 1993; 7: 124-9.
- 28.- O'Shaughnessy IM, Kasdorf GM, Hoffmann RG, Kalkhoff RK. Does aging intensify the insulin resistance of human obesity? *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1075-81.
- 29.- Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow up study. *Diabetes* 1975; 23: 105-11.
- 30.- Panzram G. Mortality and survival in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1987; 30: 123-131.

- 31.- Panzram G, Zabel-Langhennig R. Prognosis of diabetes mellitus in a geographically defined population. *Diabetologia* 20; 587-91.
- 32.- Anderson DKG, Svärdsudd K. Long-term glycaemic control relates to mortality in type II diabetes. *Diabetes Care* 1995; 18: 1534-43.
- 33.- Stanik S, Marcus R. Insulin secretion improves following dietary control of plasma glucose in severely hyperglycemic obese patients. *Metabolism* 1980; 29: 346-50.
- 34.- Hughes TA, Gwynne JT Switzer BR, et al. Effects of caloric restriction and weight loss on glycaemic control, insulin release and resistance, and atherosclerotic risk in obese patients with type II diabetes mellitus. *Am J Med* 1984; 77: 7-17.
- 35.- Lebovitz HE. Oral antidiabetic agents. In: Joslin's diabetes mellitus. Kahn CR, Weir GC. Lea & Fabiger 1994. Thirteenth edition. 508-29.
- 36.- Gerich JE. Oral hypoglycemic agents. *N Engl J Med* 1989; 321: 1231-1245.
- 37.- Groop LC. Sulfonylureas in NIDDM. *Diabetes Care* 1992; 15: 737-54.
- 38.- Pfeifer MA, Jalter JB, Judzewitsch RG, et al. Acute and chronic effects of sulfonylurea drugs on pancreatic islet function in man. *Diabetes Care* 1984; 7: s25-s34.
- 39.- Schmid-Antomarchi H, DeWuille J, Fosset M, Lazdunski M. The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 15840-4.
- 40.- Nelson TY, Gaines KL, Rajan AS, et al. Increase cytosolic calcium: a signal for sulfonylurea-stimulated insulin release from beta cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 2608-12.
- 41.- Panten U, Zünkler BJ, Scheit S, et al. Regulation of energy metabolism in pancreatic islets by glucose and tolbutamide. *Diabetologia* 1986; 29: 648-54.
- 42.- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, et al. Cloning of the beta cell high affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268: 423-26.
- 43.- Malaisse WJ, Lebrun P. Mechanisms of sulfonylurea induced insulin release. *Diabetes Care* 1990; 13: s9-s17.
- 44.- Wollheim CB, Biden TJ. Signal transduction in insulin secretion: comparison between fuel stimuli and receptor agonists. *Ann NY Acad Sci* 1986; 488: 317-33.
- 45.- Mirsky IA, Perisutti G, Diengott D. The inhibition of insulinase by hypoglycemic sulfonamides. *Metabolism* 1956; 5: 156-61.
- 46.- Groop LC, Groop P-H, Stenman S, et al. Do sulfonylureas influence hepatic insulin clearance? *Diabetes Care* 1988; 1: 689-90.
- 47.- Matsuda M, Kaku K, Hatao K, Kaneko T. Tolbutamide and insulin stimulation of fructose 2,6 biphosphate formation in hepatocytes differs. *Diabetes Res Clin Pract* 1986; 2: 347-51.

- 48.- Monge L, Mojena M, Ortega JL, et al. Chlorpropamide raises fructose 2,6 biphosphate concentration and inhibits gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 1986;
- 49.- Patel TB. Effects of tolbutamide on gluconeogenesis and glycolysis in isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 1986; 250: E82-6.
- 50.- McCormick K, Williams MC, Sicoli R, Chen L. Effect of tolazamide on basal ketogenesis, glycogenesis and gluconeogenesis in liver obtained from normal and diabetic rats. *Endocrinology* 1986; 119: 1268-73.
- 51.- Patel TB. Effects of sulfonylureas on hepatic fatty acid oxidation. *Am J Physiol* 1986; 251: E241-6.
- 52.- Rogers BJ, Standaert ML, Pollet RJ. Direct effects of sulfonylurea agents on glucose transport in the BC 3H-1 myocyte. *Diabetes* 1987; 36: 1292-6.
- 53.- Matsuda M, Kaku K, Kaneko T. Regulation of muscle fructose 2,6 biphosphate levels by sulfonylureas. *Endocrinol* 1986; 33: 913-7.
- 54.- Solomon SS, Deaton J, Shankar TP, et al. Cyclic AMP phosphodiesterase in diabetes: effect of glyburide. *Diabetes* 1986; 35: 1233-6.
- 55.- Okuno S, Inaba M, Nishizawa Y, et al. Effect of tolbutamide and glyburide on cAMP-dependent protein kinase activity in rat liver cytosol. *Diabetes* 1988; 37: 857-61.
- 56.- Altan N, Altan VM, Mikolay L, et al. Insulin-like and insulin-enhancing effects of the sulfonylurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. *Diabetes* 1985; 34: 281-6.
- 57.- Lebovitz HE, Feinglos MN, Bucholtz HK, Lebovitz FL. Potentiation of insulin action: a probable mechanism for the anti-diabetic action of sulfonylurea drugs. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 601-4.
- 58.- Kolterman OG, Gray RX, Shapiro G, et al. The acute and chronic effects of sulfonylurea therapy in type II diabetic subjects. *Diabetes* 1984; 33: 346-54.
- 59.- Ward G, Harrison LC, Proietto J, et al. Gliclazide therapy is associated with potentiation of postbinding insulin action in obese non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes* 1985; 34: 241-5.
- 60.- Pontiroli AE, Alberetto M, Bertoletty A, et al. Sulfonylureas enhance in vivo the effectiveness of insulin in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1984; 16: s26-s31.
- 61.- Pernet A, Trimble ER, Kuntschen F, et al. Sulfonylureas in insulin dependent diabetes: evidence for an extrapancreatic effect in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 247-51.
- 62.- Farber OK, Beck-Nielsen H, Binder C, et al. Acute actions of sulfonyurea drugs during long-term treatment of NIDDM. *Diabetes Care* 1990; 13: s26-31.

- 63.- Kadowaki S, Taminato T, Chiba T, et al. Effect of tolbutamide on insulin, glucagon and somatostatin release from the diabetic rat pancreas with special reference to glucose concentration. *Endocrinology* 1983; 112: 2187-92.
- 64.- Sumi S, Ichihara K, Nonaka K, Tarui S. Effect of the discontinuation of long term sulfonylurea treatment on blood glucose and insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocrinol* 1982; 29: 41-7.
- 65.- Rossetti L, Smith D, Shulman GI, et al. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest* 1987; 79: 1510-5.
- 66.- Garvey WT, Olefsky JM, Griffin J, et al. The effect of insulin treatment on insulin secretion and insulin action in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1985; 34: 222-34.
- 67.- Scarlett JA, Gray RS, Griffin J, et al. Insulin treatment reverses the insulin resistance of type II diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1982; 5: 353-63.
- 68.- Scarlett JA, Kolterman OG, Ciaraldi TP, et al. Insulin treatment reverses the post-receptor defect in adipocyte 3-O-methylglucose transport in type II diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56: 1195-201.
- 69.- Ginsberg H, Rayfield EJ. Effect of insulin therapy on insulin resistance in type II diabetic subjects: evidence for heterogeneity. *Diabetes* 1981; 30: 739-45.
- 70.- Nankervis A, Proietto J, Aitken P, et al. Differential effects of insulin therapy on hepatic and peripheral insulin sensitivity in type II diabetes. *Diabetologia* 1982; 23: 320-5.
- 71.- Hidaka H, Nagulesparan M, Klimes I, et al. Improvement of insulin secretion but not insulin resistance after short term control of plasma glucose in obese type II diabetics. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 217-22.
- 72.- Firth RC, Bell PM, Rizza RA. Effects of tolazamide and exogenous insulin on insulin action in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1986; 314: 1280-6.
- 73.- Firth RC. Insulin: either alone or combined with oral hypoglycemic agents. *Primary Care* 1988; 15: 665-83.
- 74.- Simonson DC, Delprato S, Castellino P, et al. Effect of glyburide on glycemic control, insulin requirement, and glucose metabolism in insulin-treated diabetic patients. *Diabetes* 1987; 36: 136-46.
- 75.- Pfeifer MA, Brunzell JD, Best JD, et al. The response of plasma triglyceride cholesterol and lipoprotein lipase to treatment in non-insulin-dependent diabetic subjects without familial hypertriglyceridemia. *Diabetes* 1983; 32: 525-31.
- 76.- Kasim SE, LeBoeuf RC, Rockett MJ, et al. The effects of oral agent or insulin treatments on the plasma lipoproteins and the plasma lipoprotein lipase activator in diabetic patients. *Horm Metab Res* 1986; 18: 190-3.
- 77.- Bayley CJ. Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 1992; 15: 755-72.

- 78.- Bloomgarden ZT. Metformin. *Diabetes Care* 1995; 18: 1078-80.
- 79.- Barzilai N. Clinical use of Metformin in the United States. *Diabetes Spectrum* 1995; 8: 194-7.
- 80.- Klip A, Leiter LA. Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care* 1990; 13: 696-704.
- 81.- Wiernsperger N, Rapin JR. Metformin-insulin interactions: from organ to cell. *Diab Met Rev* 1995; 11: s3-s12.
- 82.- Scheen AJ, Letiexhe MR, Lefèbvre PJ. Short administration of Metformin improves insulin sensitivity in android obese subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetic Med* 1995; 12: 985-9.
- 83.- Lalau JD, Lacroix C, Compagnon P, et al. Role of metformin accumulation in metformin-associated lactic acidosis. *Diabetes Care* 1995; 18: 779-84.
- 84.- Clarke BF, Duncan LJP. Comparison of chlorpropamide and metformin treatment on weight and blood-glucose response of uncontrolled obese diabetics. *Lancet* 1968; 1:123-6.
- 85.- Lim P, Khoo OT. Metformin compared with tolbutamide in the treatment of maturity-onset diabetes mellitus. *Med J Aust* 1970; 1: 271-3.
- 86.- Clarke BF, Campbell IW. Comparison of metformin and chlorpropamide in non-obese maturity-onset diabetes uncontrolled by diet. *BMJ* 1977; 2: 1576-8.
- 87.- Collier A, Watson HH, Patrick AW, et al. Effect of glycaemic control metformin and gliclazide on platelet density and aggregability in recently diagnose type II diabetic patients. *Diabetes Metab* 1989; 15: 420-5.
- 88.- Reaven GM, Johnston P, Hollenbeck CB, et al. Combined metformin sulfonylurea treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes in fair to poor glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1020-6.
- 89.- Hermann LS, Scerstén B, Kjellström T, et al. Therapeutic comparison of metformin and sulfonylurea, alone and in various combinations. *Diabetes Care* 1994; 17: 1100-9.
- 90.-Ashcroft FM, Gribble FM. ATP sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 1999; 42: 903-19.
- 91.- Malaisse WJ. Stimulation of insulin release by non-sulphonylurea hypoglycemic agents: the meglitinide family. *Horm Metab Res* 1995; 27: 263-6.
- 92.-Le Brignand L, Virsolvy A, et al. Stimulation of insulin release from the MIN6 cell line by a new imidazoline compound, S-21663: evidence for the existence of a novel imidazoline site in β -cells. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1021-6.
- 93.- Laghmich A, Ladrière L, Malaisse-Lagee F, et al. Stimulation of biosynthetic activity by novel succinate esters in rat pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 909-13.

- 94.- Kowluru A. Adenine and guanine nucleotide-specific succinylCoA synthetases in the clonal beta-cell mitochondria: implications in the beta-cell high-energy phosphate metabolism in relation to physiological insulin secretion. *Diabetologia* 2000; 44: 89-94.
- 95.- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors, nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-88.
- 96.- Bailey CJ, Day C. Thiazolidinediones today. *Br J Diab Vasc Dis* 2001; 1: 7-13.
- 97.- Mudaliar SM, Henry RR. New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: the glitazones or insulin sensitizers. *Ann Rev Med* 2001; 52: 239-57.
- 98.- Yki-Jarvinen H, Kauppila M, Kujansuu E, et al. Comparison of insulin regimens in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1992; 327: 1426-33.
- 99.- Lebovitz HE, Pasmantier RM. Combination Insulin-sulfonylurea therapy. *Diabetes Care* 1990; 13: 667-74.
- 100.- Aguilar CA, Wong B, Gómez-Pérez FJ, Rull JA. Combination daytime chlorpropamide-metformin/bedtime insulin in treatment of secondary failure in non-dependent diabetes. *Rev Inv Clín* 1992; 44: 71-6.
- 101.- Rossetti L, Giaccari A, De Fronzo R. Glucose toxicity. *Diabetes Care* 1990; 13: 610-27.
- 102.- Vjorinen-Markkola H, Yki-Jarvinen H. Hyperuricemia and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 25-9.
- 103.- Karhapää P, Malkki M, et al. Isolated low HDL-cholesterol. *Diabetes* 1994; 43: 411-7.
- 104.- Coniff RF, Shapiro JA, Seaton TB, et al. Multicenter, placebo-controlled trial comparing acarbose (BAY g5421) with placebo, tolbutamide, and tolbutamide-plus-acarbose in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98: 443-51.
- 105.- Gelding SV, Robinson S, Lowe S, Nithyananthan, Johnston DG. Validation of the low dose short insulin tolerance test for evaluation of insulin sensitivity. *Clinical Endocrinology* 1994; 40: 611-5.
- 106.- Bonora E, Moghetti P, Zaccanaro C, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 374-8.
- 107.- Hovorka R, Jones RH. How to measure insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 1994; 10: 91-117.
- 108.- Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* 1994; 17: 152-4.
- 109.- Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 1999; 22: 1462-70.

- 110.- Van Cauter E, Mestrez F, Sturis J, Polonsky K. Estimation of insulin secretion rates from C peptide levels. *Diabetes* 1992, 41: 368-77.
- 111.- Avogaro A, et al. Stable-label intravenous glucose tolerance test minimal model. *Diabetes* 1989, 38: 1048-55.
- 112.- Cobelli C, et al. Estimation of insulin sensitivity and glucose clearance from minimal model. New insights from labeled IVGTT. *Am J Physiol* 1986, 250; E591-8.
- 113.- Bergman N, et al. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 1979, 236; E667-77.
- 114.- Zachwieja JJ, et al. Resistance exercise and growth hormone administration in older men: effects on insulin sensitivity and secretion during a stable-label intravenous glucose tolerance test. *Metabolism* 1996, 45; 254-60.
- 115.- Rosenbloom AL, Young SR, Jennie JR, Winter EV. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 1999; 2: 345-54.
- 116.- American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 2000; 23: 381-9.
- 117.- Berger B, Stenström G, Sundkvist G. Incidence, prevalence and mortality of diabetes in a large population. A report from the Skaraborg Diabetes Registry. *Diabetes Care* 1999; 22: 773-7.
- 118.- Hsueh WC, Mitchel BD, Abuomia R, et al. Diabetes in the old order Amish. *Diabetes Care*, 2000; 23: 595-601.
- 119.- Lindahl B, Weinehall L, Asplund K, Hallmans G. Screening for impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1988-92.
- 120.- The DECODE study group on behalf of the European diabetes epidemiology group. Consequences of the new diagnostic criteria for diabetes in older men and women. *Diabetes Care* 1999; 22: 1667-71.
- 121.- Vaccaro O, Ruffa G, Imperatore G, et al. Risk of diabetes in the new diagnostic category of impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 1999; 22: 1490-3. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. *Diabetes Care* 1999; 22: 233-40.
- 122.- Bjornholt JV, Erikssen G, Aaser E, et al. Fasting blood glucose: An underestimated risk factor for cardiovascular death. *Diabetes Care* 1999; 22: 45-9.
- 123.- Balkau B, Bertrais S, Ducimetiere P, Eschwege E. Is there a glycemic threshold for mortality risk? *Diabetes Care* 1999; 22: 696-9.
- 124.- Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, et al. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. *Diabetes Care*, 1999; 22: 920-4.

- 125.- The DECODE study group on behalf of the European diabetes epidemiology group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* 1999; 354: 617-21.
- 126.- Bouma M, Dekker JH, Sonnaville JJ, et al. How valid is fasting plasma glucose as a parameter of glycemic control in non-insulin-using patients with type 2 diabetes? *Diabetes Care* 1999; 22: 904-7.
- 127.- Avignon A, Radauceanu A, Monnier L. Non-fasting plasma glucose is a better marker of diabetic control than fasting plasma glucose in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1997; 20: 1822-26.
- 128.-Mugge M, Zoppini G, Bonora E, et al. Fasting plasma glucose variability predicts 10-year survival of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000; 23: 45-50.
- 129.- Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1269-76.
- 130.- De Marco R, Locatelli F, Zoppini G, et al. Cause-specific mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 756-61.
- 131.- Su-Chi L, E-Shyong T, et al. Cardiovascular risk profile in individuals with borderline glycemia. *Diabetes Care* 2000; 23: 278-82.
- 132.- Matsumoto K, Miyake S, Yano M, et al. Insulin resistance and classic risk factors in type 2 diabetic patients with different subtypes of ischemic stroke. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1191-5.
- 133.- Bonora E, Kiechl S, Oberhollenzer F, et al. Impaired glucose tolerance, type II diabetes and carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck Study. *Diabetologia*, 2000; 43: 156-64.
- 134.- Biderman A, Rosenblatt I, Rosen S, et al. Sex differentials in predictors of mortality for patients with adult-onset diabetes. *Diabetes Care*, 2000; 23: 602-5.
- 135.- Murray CJL, Lopez A. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 1997; 349: 1436-42.
- 136.- Murray CJL, Lopez A. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 1997; 349: 1498-504.
- 137.- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 1998; 352: 837-53.
- 138.- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*, 1998; 352: 854-65.
- 139.- Nathan DM. Some answers, more controversy, from UKPDS. *Lancet*, 1998; 352: 832-3.

- 140.- American Diabetes Association. Implications of the United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Diabetes Care*, 2000; 23: S27-31.
- 141.- Bloomgarden ZT. The European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting, 1998. *Diabetes Care*, 1999; 22: 989-95.
- 142.- Gaede P, Vedel P, Parving HH, Pedersen O. Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomized study. *Lancet*, 1999; 353: 617-22.
- 143.- Shichiri Mo, Kishikawa H, Ohkubo Y, Wake N. Long-term results of the Kumamoto Study on optimal diabetes control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2000; 23: B21-B29.
- 144.- Bruno G, Merletti F, Boffetta P, et al. Impact of glycaemic control, hypertension and insulin treatment on general and cause-specific mortality: an Italian population-based cohort of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1999; 42: 297-301.
- 145.- Haffner SM. Epidemiological studies on the effects of hyperglycemic and improvement of glycemic control on macrovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: C54-C56.
- 146.- Stern MP. Impact of glucose control in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 23: C57-C60.
- 147.- Vaaler S. Optimal glycemic control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2000; 23: B30-B34.
- 148.- Klein R, Klein BEK. Relation of glycemic control to diabetic complications and health outcomes. *Diabetes Care*, 1998; 21: C39-C43.
- 149.- Testa MA, Simonson DC, Turner RR. Valuing quality of life and improvements in glycemic control in people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1998; 21: C44-C52.
- 150.- Harris MI. Health care and health status and outcomes for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2000; 23: 754-8.
- 151.- Evans JMM, MacDonald TM, Leese GP, et al. Impact of type 1 and type 2 diabetes on patterns and costs of drug prescribing. *Diabetes Care*, 2000, 23: 770-4.
- 152.- Krop JS, Saudek CD, Weller WE, et al. Predicting expenditures for Medicare beneficiaries with diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1660-6.
- 153.- Nichols GA, Hillier TA, Javor K, Betz Brown J. Predictors of glycemic control in insulin-using adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2000; 23: 273-7.
- 154.- Cook CB, Ziemer DC, El-Kebbi I, et al. Diabetes in urban African Americans. XVI. Overcoming clinical inertia improves glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1494-500.

- 155.- Van der Does FEE, De Neeling JND, Snoek FJ, et al. Randomized study of two different target levels of glycemic control within the acceptable range in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1998; 21: 2085-93.
- 156.- Benjamin EM, Schneider MS, Hinchey KT. Implementing practice guidelines for diabetes care using problem-based learning. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1672-8.
- 157.- Fisher L, Chesla CA, Skaff MM, et al. The family and disease management in Hispanic and European American patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2000; 23: 267-72.
- 158.- Deichman RE, Castello E, Horswell R, Friday KE. Improvements in diabetic care as measured by HbA1c after a physician education project. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1612-6.
- 159.- Du Pasquier-Fediawvsky L, Tubiana-Rufi N, The PEDIAB collaborative Group. Discordance between physician and adolescent assessments of adherence to treatment. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1445-9.
- 160.- Trief PM, Aquilino C, Paradies K, Weinstock RS. Impact of the work environment on glycemic control and adaptation to diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 569-74.
- 161.- Weller SC, Baer RD, Pachter LM, et al. Latino beliefs about diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 722-8.
- 162.- Fitzgerald JT, Gruppen LD, Anderson RM, et al. The influence of treatment modality and ethnicity on attitudes in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2000; 23: 313-8.
- 163.- Lustman PJ, Anderson RJ, Freedland KE, et al. Depression and poor glycemic control. *Diabetes Care*, 2000; 23: 934-42.
- 164.- Valle T, Koivisto VA, Reunanen A, et al. Glycemic control in patients with diabetes in Finland. *Diabetes Care*, 1999; 22: 575-9.
- 165.- Hu D, Henderson JA, Welty TK, et al. Glycemic control in diabetic American Indians. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1802-7.
- 166.- Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM. Effect of energy restriction, weight loss, and diet composition on plasma lipids and glucose in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 889-95.
- 167.- Effects of aerobic or resistance exercise and/or diet on glucose tolerance and plasma insulin levels in obese men. *Diabetes Care*, 1999; 22: 684-91.
- 168.- Hays LM, Clark DO. Correlates of physical activity in a sample of older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 706-12.
- 169.- Walker KZ, Sunil Piers L, Putt RS, et al. Effects of regular walking on cardiovascular risk factors and body composition in normoglycemic women and women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 555-61.

- 170.- Redmon JB, Rantz SK, Kwong CA, et al. Pharmacologic induction of weight loss to treat type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 896-903.
- 171.-De Fronzo RA, Goodman AM and the Multicenter Metformin Study Group. Efficacy of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 333: 541-549.
- 172.- Reaven GM, Johnston P, Hollenbeck CB, et al. Combined metformin-sulfonylurea treatment of patients with non-insulin dependent diabetes mellitus in fair to poor glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1020-1026.
- 173.- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*, 1998; 352: 854-65.
- 174.- Rains SGH, Wilson GA, Richmorg W, et al. The effect of glibenclamide and metformin on serum lipoproteins in type 2 diabetes. *Diab Med* 1988; 5: 653-658.
- 175.- Abbasi F, Kamath V, Rizvi AA, et al. Results of a placebo-controlled study of the metabolic effects of the addition of metformin to sulfonylurea treated patients. *Diabetes Care*, 1997; 20: 1863-9.
- 176.- Hermann LS, Scerstén B, Kjellström T, et al. Therapeutic comparison of metformin and sulfonylurea, alone and in various combinations. *Diabetes Care* 1994; 17: 1100-9.
- 177.- Tripathy D, Carlsson M, Almgren P, et al. Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance. Lessons from the Botnia study. *Diabetes* 2000; 49: 975-980.
- 178.- Saad M, Anderson R, Laws A. A comparison between the minimal model and the glucose clamp in the assessment of insulin sensitivity across the spectrum of glucose tolerance: for the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 1994; 43: 1114-1121.
- 179.- Mather K, Hunt E, Steinberg H. Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: Implications for research applications. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5457-5464.
- 180.- Patane G, Piro S, Rabuazzo AM, et al. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose. *Diabetes* 2000; 49: 735-740.
- 181.- Lupi R, Del Guerra S, Fierabracci V, et al. Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes* 2002; 51: S134-S137.
- 182.- Lupi R, Marchetti P, Giannarelli R, et al. Effects of glibenclamide and metformin (alone or in combination) on insulin release from isolated human pancreatic islets. *Acta Diabetol* 1997; 34: 46-48.
- 183.- Lupi R, Del Guerra S, Tellini C, et al. The biguanide compound metformin prevents desensitization of human pancreatic islets induced by high glucose. *Eur J Pharmacol* 1999; 8: 205-209.

- 184.- Zhou YP, Berggren PO, Grill VE. A fatty acid-induced decrease in pyruvate dehydrogenase activity is an important determinant of beta cell dysfunction in the obese diabetic db/db mouse. *Diabetes* 1996; 45: 580-586.
- 185.- Zhou YP, Grill VE. Palmitate-induced beta cell insensitivity to glucose is coupled to decrease pyruvate dehydrogenase activity and enhanced kinase activity in rat pancreatic islets. *Diabetes* 1995; 44: 394-399.
- 186.- Gregorio F, Ambrosi F, Manfredi S, et al. Metformin, plasma glucose and free fatty acids in type 2 diabetic patients: results of a clinical study. *Diabetes Res Clin Pract* 1997; 37: 21-33.
- 187.- Ashcroft FM, Friddle FM. ATP sensitive K channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 1999; 42: 903-919.
- 188.- Levy J, Atkinson AB, Bell PM, et al. Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study. *Diabet Med* 1998; 15: 290-296.
- 189.- Zander M, Taskiran M, Toff-Nielsen MB, et al. Additive glucose lowering of glucagon like peptide 1 and metformin in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 720-725.
- 190.- Morel Y, Golay A, Perneger T, et al. Metformin treatment leads to an increase in basal, but not insulin-stimulated, glucose disposal in obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 1999; 16: 650-655.
- 191.- Song S, Andrikopoulos S, Filipis C, et al. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am J Physiol* 2001; 281: E 275-E 282.
- 192.- Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1167-1174.
- 193.- Winder WW, Hardie DG. AMP activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999; 277: E1-E10.
- 194.- Olsson J. et al. Increased mortality in type 2 diabetic patients using sulphonylurea /metformin combination; a population-based study. *Diabetologia* 2000; 43: 558-560.
- 195.- Fisman EZ, Tenenbaum A, Boyko V, et al. Oral antidiabetic treatment in patients with coronary disease; time related increased mortality on combined glyburide/metformin therapy over a 7.7 year follow up. *Clin. Cardiol.* 2001; 24: 151-158.
- 196.- Cook CB, Erdman DM, Ryan GJ, et al. The pattern of dyslipidemia among urban African Americans with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2000; 23: 319-24.
- 197.- Mayer-Davis EJ, Levin S. Heterogeneity in associations between macronutrient intake and lipoprotein profile in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1632-39.
- 198.- Flavell DM, Pineda Torra I, Jamshidi Y, et al. Variation in the PPAR α gene is associated with altered function in vitro and plasma lipid concentrations in type II diabetic subjects. *Diabetologia*, 2000; 43: 673-80.

- 199.- Dey J, Blonde L, Guthrie R. Factors influencing patient acceptability of diabetes treatment regimens. *Clinical Diabetes*, 2000; 18: 61-5.
- 200.- Jarvi AE, Karlström BE, Granfeldt YE, et al. Improved glycemic control and lipid profile and normalized fibrinolytic activity on a low-glycemic index diet in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 1999; 22: 10-18.
- 201.- Frost G, Leeds AA, Doré CJ, et al. Glycaemic index as a determinant of serum HDL-cholesterol concentration. *Lancet*, 1999; 353: 1045-8.
- 202.- Watanabe N, Taniguchi T, Takeh H, et al. Elevated remnant-like lipoprotein particles in impaired glucose tolerance and type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 1999; 22: 152-6.
- 203.- Ambrosio A, Mühlen I, Kopf D, et al. LDL size distribution in relation to insulin sensitivity and lipoprotein pattern in young and healthy subjects. *Diabetes Care*, 1998; 21: 2077-84.
- 204.- Festa A, D'Agostino R, Mykkänen L, et al. LDL particle size in relation to insulin, proinsulin, and insulin sensitivity. *Diabetes Care*, 1999; 22: 1688-93.
- 205.- Wagner AM, Pérez A, Calvo F, et al. Apolipoprotein (B) identifies dyslipidemic phenotypes associated with cardiovascular risk in normocholesterolemic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 1999; 22: 812-7.
- 206.- Duvillard L, Pont F, Florentin E, et al. Significant improvement of apolipoprotein B-containing lipoprotein metabolism by insulin treatment in-patient with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2000; 43: 27-35.
- 207.- McEneny J, O'Kane MJ, Moles KW, et al. Very low-density lipoprotein subfractions in type II diabetes mellitus: alterations in composition and susceptibility to oxidation. *Diabetologia*, 2000; 43: 485-93.
- 208.- Ferozhi NG, Jenkinson G, Thomas EL, et al. Relation of triglyceride stores in skeletal muscle cells to central obesity and insulin sensitivity in European and south Asian men. *Diabetologia*, 1999; 42: 932-5.
- 209.- Johnson B, Cook JR, Pedersen TR. The cost-effectiveness of lipid lowering in patients with diabetes: results from the 4S trial. *Diabetologia*, 1999; 42: 1293-1301.
- 210.- Boemi M, Sirolla C, Fumelli P, James RW. Renal disease as a determinant of increased lipoprotein (a) concentrations. *Diabetes Care* 1999; 22: 2033-6.
- 211.- Meigs JB, Ordovas JM, Cupples LA, et al. Apolipoprotein E polymorphism are not associated with insulin resistance. *Diabetes Care*, 2000; 23: 669-74.
- 212.- Konrad T, Vicini P, Kusterer K, et al. α -lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; 22: 280-7.

The combination metformin/glyburide exerts its hypoglycemic effect mainly by increasing insulin secretion: A controlled, randomized, double-blind, crossover study

A. Gullias-Herrero*, C.A. Aguilar-Salinas**, F.J. Gómez-Pérez** and J.A. Rull*

ABSTRACT. The aim of the present study was to describe the mechanism by which the combination glyburide/metformin exerts its additive hypoglycemic effects. This is a double-blind, randomized and crossover clinical trial. Patients (n=20) were included in a run-in period of 8 weeks in which an isocaloric diet was prescribed. If they did not achieve the treatment goals (n=15), they received glyburide, metformin or combined treatment for 10 weeks each using three possible sequences. The dosage was adjusted to reach fasting plasma glucose (FPG) <7.7 mmol/l. Treatment periods were separated by a 6-12 week washout period. At the beginning and the end of every treatment, insulin sensitivity and insulin secretion were measured by means of a minimal model and an oral glucose tolerance test. All treatment periods were completed by 12 cases. The glycemic goal was reached in 1 case during metformin, in 5 during glyburide and in 10 during the combination. The greatest reduction in HbA_{1c} was achieved during the combination (HbA_{1c} 11±1.6 vs 9.8±1.9 vs 9.0±2.1% for metformin, glyburide and the combination, *p*<0.001). Increased insulin secretion was the explanation for the additive effects of the combination (percentual change in acute insulin response during the minimal model= 5.8 vs 51.5 vs 88.2% for metformin, glyburide and the combination, *p*<0.05). No change in insulin sensitivity resulted from the treatments. In conclusion, the additive hypoglycemic effects of the combination glyburide/metformin was caused by increased insulin secretion.

Diab. Nutr. Metab. 16: 268-276, 2003.

© 2003, Editrice Kurtis.

INTRODUCTION

Most patients require therapy with anti-hyperglycemic agents several years after Type 2 diabetes mellitus (T2DM) has been diagnosed (1, 2). Monotherapy with oral agents is the most commonly used form of treatment (3). Insulin secretagogues (*ie* sulfonylureas) are preferred in patients with hyperglycemia and near normal weight; the use of insulin sensitizers (*ie* metformin) is useful in those with mild-hyperglycemia and overweight (4). However, the long-term efficacy of either one of those treatments is far from ideal. Data of the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) clearly demonstrate that monotherapy has a high rate of failure to maintain glycemic control at target levels (5-6). The addition of a second oral agent or insulin becomes necessary to improve control. The most-used combination of oral agents is glyburide plus metformin (7, 8). Several trials have shown that sig-

nificant additive effects are obtained by the combination of these agents (9-11). HbA_{1c} levels are reduced by 1.5 to 2% below the level achieved by either agent alone. However, the mechanisms by which the hypoglycemic actions are potentiated have still not been described. Increased insulin secretion or improved insulin sensitivity are among the possible explanations.

*Department of Medicine, **Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico.
Key words: Metformin, glyburide, diabetes, obesity, insulin.

Correspondence to: Carlos A. Aguilar-Salinas, M.D., Department of Endocrinology and Metabolism, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga #15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico.

E-mail: caguilaralinas@yahoo.com

Received 4 July 2002; accepted 13 June 2003.

Our objective was to analyze the effect of metformin, glyburide and the combination of both on glycemic control, insulin sensitivity and secretion in hyperglycemic, overweight patients with T2DM on a double-blind crossover study.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Subjects

All patients had previously been diagnosed with T2DM according to the criteria of the ADA and were 40 years or older. Their body mass index (BMI) had to be 25-35 kg/m² after four weeks of an isocaloric diet prescribed and supervised by a registered dietitian. Also, HbA_{1c} concentrations had to be above 7% and fasting plasma glucose (FPG) higher than 5.5 mmol/l at their inclusion to the study. Patients should have received no prior therapy other than diet and exercise for T2DM. Candidates were excluded if they had Type 1 diabetes mellitus (T1DM), uncontrolled hypertension, severe renal dysfunction, nephrotic syndrome, active liver disease or hepatic enzyme elevation (serum AST or ALT >2.5 times the upper limit of normal), or were females of child-bearing potential not using barrier, non-hormonal IUD or surgical contraception, pregnant or lactating, or had symptomatic angina pectoris or cardiac insufficiency, occurrence of a major vascular event within three months prior to screening or diagnosis of a serious or chronic disease which would threaten the patients' safety or life expectancy. Concomitant use of antiobesity medication, bile acid sequestrants, cyclosporine or any drug with potential effects on lipid metabolism was not allowed during the study or in the previous 3 months.

The Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición approved the protocol and every patient provided witnessed, written, informed consent prior to entering the study.

Study design

This was a single center, double-blind, crossover study (Fig. 1). It included an 8-week run-in period and 3 treatment periods of 10 weeks each with either metformin, glyburide or combination therapy. Between these phases, a 6-12 week washout period assured the comparability between treatments. A registered dietitian evaluated patients at every visit. An isocaloric phase I diet was recommended during the entire study (12). During the run-in period,

patients were seen every two weeks and instructed to follow the dietary recommendations. Their adherence to these changes was measured at every visit using a prospective 3-day food record. Cases that had FPG below 7.7 mmol/l or above 19.4 mmol/l or those who failed to adhere to the diet were not included to the treatment phase. On visit 5, patients were randomized to receive their first drug treatment. The treatment sequences were previously prepared for having, at the end of the study, a similar number of patients treated with metformin, glyburide or its combination in every phase. Treatments were administered in a double-blind fashion. Patients received two bottles containing identical pills of metformin 500 mg or glyburide 5 mg, or placebo. The maximal doses were 2 g/day for metformin and 20 mg/day for glyburide. Cases started every treatment period taking one pill; the dose was increased weekly until the glycemic goal (FPG <7.7 mmol/l) or the maximal dose was achieved. Once one of these goals was achieved, cases were seen every 4 weeks until the end of the treatment phase. The adjustment of the dosage was based on the FPG and the following cut-points:

FPG 7.7-10 mmol/l=1 pill of every bottle/day

FPG 10-12.2 mmol/l=2 pills of every bottle/day

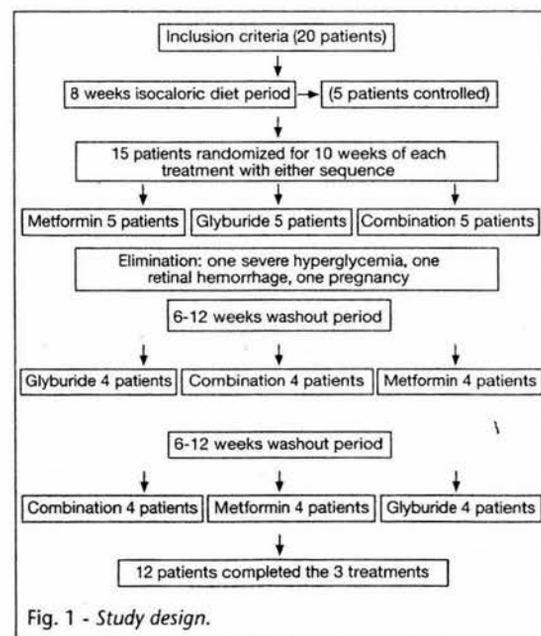


Fig. 1 - Study design.

FPG 12.2-14.4 mmol/l=3 pills of every bottle/day
 FPG 14.4-16.6 mmol/l=4 pills of every bottle/day.
 When the minimal dose was used, patients received it in the morning. However, if additional adjustments were required, the administration of the pills was distributed before each meal following this sequence: breakfast, dinner and supper. Pills were counted every visit. Those who developed hypoglycemia using the minimal dosage of any of the treatments, concomitant illnesses or adherence to the drug treatment lower than 80% were excluded from further follow-up. After the completion of every treatment period, patients were seen every two weeks. The next phase was started when the FPG was ≥ 7.7 mmol/l. The mean duration of the washout was 6 weeks (range 2-10 weeks).

Efficacy parameters

At the beginning and end of every treatment period, a minimal model (minmod) and a 2-hour oral glucose tolerance test (OGTT) were performed in every patient. The concentrations of glucose, insulin, C-peptide, cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C), LDL cholesterol (LDL-C), triglycerides, apolipoprotein B (Apo B), HbA_{1c}, lactate and pyruvate were also measured after a 9-12 fasting period. The insulin sensitivity index (Si), acute insulin response (AIRg) and glucose effectiveness (Sg) were determined from the minmod, as previously described (13). Insulin sensitivity was estimated also during a 2-hour OGTT using the method described by Matsuda (14). The area under the curve of glucose (AUCg), insulin (AUCi) and C-peptide (AUCpc) were calculated by the trapezoid method during the same test.

Safety evaluation

Before entering the baseline phase, a complete physical examination and clinical laboratory evaluation were performed. The laboratory evaluation included a blood count, pregnancy test, urine exam, CK levels, liver function tests and a glycemic profile (FPG, HbA_{1c} and fructosamine). These tests were repeated at the end of every treatment phase. At each visit, the liver function tests and glycemic profile were measured. An ALT or AST concentration 3 times above the upper limit of normal at 2 consecutive measurements one week apart (± 3 days) was considered as indication for elimination from the study.

Laboratory analyses

The laboratory of the Department of Endocrinology and Metabolism of the Instituto Nacional de la Nutrición performed all lipid and clinical laboratory measurements using standardized procedures. This laboratory is certified for standardization of the tests by the External Comparative Evaluation of Laboratories Program of the College of American Pathologist. Blood samples were taken after an overnight fast (9-12 hr). All laboratory analysis was performed with commercially available standardized methods. Glucose was measured using the glucose oxidase method. HbA_{1c} using latex immunoagglutination inhibition (Bayer laboratories). Total serum cholesterol and triglycerides were measured using an enzymatic method (SERA-PAK®) (CV 3.3%). HDL cholesterol was precipitated with fosfotungstic acid and Mg⁺⁺ (CV 2.5%). LDL cholesterol concentration was estimated by the Friedewald formula. Apoprotein B concentration was measured by an immunonephelometric method. Insulin concentrations were estimated using a radioimmunoassay method (Abbott, Japan). Serum free fatty acids were measured using a colorimetric method (NEFA kit, WAKO, Co). Lactate and pyruvate were measured by an enzymatic autoanalyzer (Sigma, USA).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation. Differences between treatment phases were measured using analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements, followed by the Bonferroni adjustment. For categorical variables, the χ^2 test was used. All testing was two-tailed and conducted at a 5% level of significance. A stepwise multiple regression analysis was carried out to identify the predictors of improvement of glycemic control. All calculations were done using the statistical package SPSS for Windows release 9.0 (SPSS, Chicago).

RESULTS

Twenty patients were included to the run-in period. The dietary therapy was enough to decrease the FPG below 7.7 mmol/l in five cases. Fifteen subjects fulfilled the selection criteria and were randomly assigned to one of three possible sequences. Of them, three patients were excluded during the first treatment period. The reasons were pregnancy, a retinal hemorrhage and severe hy-

Table 1 - Effects of glyburide, metformin and combined treatment on carbohydrate metabolism.

Variable	Time	Metformin n=12	Glyburide n=12	Combination n=12	ANOVA between treatments
Weight (kg)	Pre	72.9±10.7	72.4±12.3	73.0±11.1	>0.01
	Post	73.0±12.1	73.2±9.9*	73.6±13.1	
Glucose (mmol/l)	Pre	11.9±3.2	11.5±3.1	13.2±3.7	<0.01
	Post	10.1±2.7*	8.8±3.5*	7.1±2.2*	
Insulin (pmol/l)	Pre	9.6±6.6	9±4.8	9.6±5.4	NS
	Post	13.2±4.8*	14.4±8.4*	15.6±12*	
HbA _{1c} (%)	Pre	10.4±2.8	10.7±2.2	11.4±2.0	NS
	Post	11.0±1.6	9.8±1.9*	9.0±2.1*	
Minimal model					
Si (x10 ⁻⁴ · min ⁻¹ · mU/ml)	Pre	1.38±1.0	0.9±0.8	1.83±1.2	NS
	Post	1.41±1.2	1.7±0.9	1.78±1.0	
Sg (mg/min ⁻¹)	Pre	0.012±0.003	0.023±0.003	0.030±0.005	NS
	Post	0.011±0.004	0.014±0.008	0.017±0.002	
AIRg (mU/ml)	Pre	89.2±58	86.4±58	70.5±47	<0.05
	Post	94.4±47*	130.9±71*	132.7±63*	
Oral glucose tolerance test					
Insulin sensitivity index (mg · mU)	Pre	3.56±2.56	3.61±2.18	3.13±1.75	NS
	Post	3.05±1.97	3.22±3.84	2.83±1.59	
AUCg (mmol/dl · min ⁻¹)	Pre	3184±488	3063±628	3374±468	<0.01
	Post	2859±548*	2766±780*	2331±440*	
AUCi (pmol/ml · min ⁻¹)	Pre	22663±7804	21798±7423	21992±8516	NS
	Post	30491±9049*	38265±9397*	37599±8202*	

Values expressed as mean±standard deviation.

Abbreviations: Pre=pre-treatment values; Post=post-treatment values; Si=insulin sensitivity index derived from the minimal model; Sg=glucose effectiveness; AIRg=acute insulin response; AUCg= area under the curve of glucose; AUCi=area under the curve of insulin; NS= non significant. *pre-treatment vs post-treatment (t test for independent groups, statistical significance $p<0.05$).

perglycemia (>19.4 mmol/l). Thus, data from 12 patients (5 males and 7 females) were included in the analysis. They were 56.4±6.1 years old and had suffered T2DM for 7.1±2.3 years. All patients were overweight; mean BMI was 27.6±3.1 kg/m². After the run-in period, the mean FPG was 11.86±2.89 mmol/l and the HbA_{1c} of 10.9±2.35%. Their mean lipid values were: cholesterol 5.5±0.90 mmol/l, HDL-cholesterol 0.89±0.20 mmol/l, LDL-cholesterol 2.89±1.08 mmol/l, triglycerides 3.55±3.22 mmol/l and apolipoprotein B 1.1±0.2 g/l.

The goal for FPG (FPG <7.7 mmol/l) was achieved in only one case during metformin treatment (8.1%), in 5 individuals on glyburide (41.6%) and in 10 subjects during combination therapy (83.3%) ($p<0.01$). The mean drug dosage per day was 1830±1250 mg for metformin, 16.7±7.5 mg for glyburide, and 1000±540 mg of metformin and 10±5.2 mg for glyburide in the combination. The percent of cases, in

which the maximal dose was needed, was 91% for metformin, 72% for glyburide and 18% for the combination ($p<0.01$). No drug-related adverse events were seen during any of the treatment periods. Body weight was not modified during either the metformin or the combination treatment phases. In contrast, a small but statistically significant increase in body weight was observed during the glyburide treatment. The effects on the glycemic control of each one of the treatments are shown in Table 1. The glycemic control was similar at the beginning of every phase, assuring the comparability between treatments. The combination resulted in significantly greater changes in FPG and HbA_{1c}. This benefit was achieved using a significantly lower dosage. Metformin treatment resulted in lower FPG, but no change was found in HbA_{1c} levels. These changes were not influenced by the order in which treatments were administered. The effects of the treatments on plasma lipids are

shown in Table 2. Lower cholesterol, LDL-cholesterol concentrations and higher HDL-cholesterol values were observed at the end of every treatment period ($p < 0.05$). However, no statistical difference was found between treatments. Glyburide resulted in lower lactate concentrations. In contrast, metformin was not associated with modifications in lactate levels. During the combination, the lactate values were lowered, but this change was significantly smaller compared to the observed during glyburide treatment. All treatments resulted in lower pyruvate levels. The effects of the treatments on insulin secretion and insulin sensitivity are shown in Table 1. Data obtained from the minimal model showed that, at baseline, patients had decreased insulin sensitivity (S_i $1.37 \pm 1.0 \times 10^4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mU/ml}$). Their mean S_i values were significantly lower than the reference ranges ($4\text{--}6 \times 10^4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mU/ml}$) reported by several groups (15, 16). Abnormally low insulin secretion responses were also found (AIRg $82 \pm 54.3 \text{ mU/ml}$). The S_i and AIRg values were not different at the beginning of every treatment period, confirming the comparability between the study phases. The acute insulin response (AIRg) during the minmod was significantly greater at the end of the

glyburide and the combined treatment periods ($p < 0.05$ between groups). Insulin sensitivity remained unchanged at the end of all treatments. Data derived from the oral glucose tolerance test confirmed the results above described. The main change observed during the combination was an increased insulin secretion, suggested by the significantly higher area under the curve for insulin observed during the OGGT. The significantly lower area under the curve of glucose confirmed the better glycemic control obtained by the use of the combination. The insulin sensitivity, estimated by the Matsuda index, was not significantly modified with any of the treatments.

The main predictors for having a FPG $< 7.7 \text{ mmol/l}$ were identified using a multivariate model. The use of combined therapy was the main predictor (F value = 8.11) for achieving the glycemic goal ($r^2 = 0.169$, $p = 0.007$ for the model). The inclusion of this variable to the model eliminates the statistical significance of all other parameters. If the treatments were not included in the model, the change in the acute insulin response (AIRg) was the main predictor (F value = 5.51; $r^2 = 0.114$, $p = 0.024$ for the model). The change found in insulin sensitivity (derived ei-

Table 2 - Effects of glyburide, metformin and combined treatment on lipid profile and lactate concentrations.

Variable	Time	Metformin n=12	Glyburide n=12	Combination n=12	ANOVA
Total cholesterol (mmol/l)	Pre	5.48±0.90	5.35±0.93	5.53±0.93	NS
	Post	5.35±0.85*	4.99±0.93*	5.14±0.67*	
HDL-c (mmol/l)	Pre	0.86±0.19	0.93±0.23	0.95±0.23	NS
	Post	0.80±0.20*	0.91±0.29	0.95±0.24	
LDL-c (mmol/l)	Pre	3.20±0.87	3.18±1.29	3.33±0.77	NS
	Post	2.92±1.03*	2.61±1.31*	3.23±0.72*	
Triglycerides (mmol/l)	Pre	3.01±1.79	2.72±1.94	2.74±1.96	NS
	Post	3.51±2.12	3.19±2.02	2.06±0.88*	
Apo A1 (g/l)	Pre	1.1±0.1	1.1±0.2	1.3±0.2	NS
	Post	1.3±0.2	1.2±0.2	1.3±0.3	
Apo B (g/l)	Pre	1.1±0.1	1.1±0.2	1.1±0.2	NS
	Post	1.2±0.2	1.1±0.2	1.1±0.2	
Lactate (mmol/l)	Pre	1.66±0.69*	1.68±0.55	1.35±0.15	<0.05
	Post	1.66±0.55	1.48±0.43*	1.29±0.24*	
Pyruvate (μmol/l)	Pre	121.5±102.2	137.4±70.4	90.8±86.3	<0.01
	Post	99.6±56.8*	106.7±73.8*	69.2±34.0*	

Values expressed as mean±standard deviation.

Abbreviations: Pre=pre-treatment values; Post=post-treatment values; HDL-c=high density lipoprotein cholesterol; LDL-c = low density lipoprotein cholesterol; Apo A1= apolipoprotein A1; Apo B= apolipoprotein B.

*pre-treatment vs post-treatment (t test for independent groups, statistical significance $p < 0.05$).

ther from the minmod or the oral glucose tolerance test) did not achieve statistical significance in any of these models.

DISCUSSION

Our data clearly show that the combination glyburide/metformin has more potent hypoglycemic effects than the observed by the single use of any of these drugs. Better glycaemic control was achieved with a smaller dose, a fact that might be important in reducing the probability of adverse reactions. The greater efficacy of the combination reported here is in accordance with previous studies (9, 10). In the UKPDS report the addition of metformin to patients treated with a sulfonylurea decreased the FPG by 0.47 mmol/dl (6). After 3 years, the group treated with the combination had HbA_{1c} level 1.3% lower than that found in glyburide-treated patients. Still, methodological issues may limit the conclusions of these studies. Many of them used a parallel design or the combination was used only in cases in which glyburide was not enough to achieve the glycaemic goal. As a result, the study groups may be heterogeneous and hard to be compared (17, 18). Furthermore, in studies in which only patients who did not reach the glycaemic goal during monotherapy received the combination have a selection bias; only the most severe cases may receive this treatment (19). Our study differs from those papers because a double-blind, crossover design was used. This approach is a potent tool for comparing the effects of the treatments and for assessing the mechanism(s) associated to those changes. Its use eliminates possible differences among treatment groups in the background abnormalities that may influence the response to treatment. Potential problems of this design are the residual bias effect and the sequence bias. These problems were avoided in this report. Before every treatment period, we confirmed that the evaluated parameters returned to the baseline conditions. No sequence showed differences in post-treatment values. Residual effects of previous treatments or effects due to the sequence were, thus, avoided and treatments had the same *a priori* probability of success.

The main goal of this report was to describe the mechanism by which the additive effects of the combined treatment of glyburide and metformin occur. The combination could be acting on both pathophysiological aspects of T2DM: insulin resistance and in-

ulin secretion (20). Our results clearly show that insulin sensitivity was not modified by the combination. This conclusion is supported by the agreement found between the two methods used for the estimation of insulin sensitivity. Both procedures are known to have a significant correlation with the euglycaemic clamp (21, 22). An increased insulin secretion was the explanation for the additive effects of the combination. Increased insulin secretory response was demonstrated during the minmod and in the OGTT. These results are in agreement with *in vitro* studies (23) in which the addition of metformin to glyburide-treated β -cells increased glucose-mediated insulin secretion. This action was observed mainly in the presence of high glucose concentrations. Also, Lupi *et al* reported that in the presence of metformin, the β -cells fully maintain the ability to increase their insulin response to glucose, even in the presence of hyperglycemia (24). Indeed, metformin may increase the ability of glyburide to stimulate insulin secretion, perhaps by more than one mechanism. In islet studies in which high concentrations of free fatty acids were kept constant, metformin prevents the deleterious effects of free fatty acids on the first phase of insulin secretion and in the glucose utilization by the β -cells (25). These observations suggest a direct protective action on human β -cells. This effect could be due to the metformin-induced reduction of the oxidation of free fatty acids in the β -cell (26). Several groups have proposed that increased oxidation of free fatty acids may lead to impaired glucose metabolism inside the islet by substrate competition and this mechanism may be one of the explanations for the selective loss of glucose responsiveness of the β -cells (27, 28). However, *in vivo* studies using equivalent doses of metformin to those used in humans are required to confirm the existence of these effects of the drug on β -cells. On the other hand, metformin may protect the β -cells by decreasing the plasma levels of free fatty acids (29). Furthermore, by decreasing the hepatic glucose production, metformin may decrease FPG and, as a result, the deleterious effect of hyperglycemia on insulin secretion. Hyperglycemia induces down regulation of glucose transporters and diminished glucose utilization, which is necessary for the movement of insulin granules through the pancreatic β -cell cytoplasm (30). These observations have several clinical implications. Combined therapy may have better results if it is used early in the course of T2DM. This assumption is based

on the progressive deterioration of the β -cell function, which is expected to happen after several years of having the disease (31). As a result, the duration of diabetes may play a role as a modifier for the response to the combination. This observation may be relevant for future studies, especially for trials with a parallel design and a small number of patients. Second, the β -cell function may determine the length of time in which the combination will be useful. The combined treatment will not be useful in patients with severe insulin deficiency. Finally, the addition of metformin to other insulin secretagogues may have additive effects also. A short-term study including 7 patients suggests that metformin increases the hypoglycemic actions of the glucagon-like peptide 1 (GLP-1), an incretin that reduces plasma glucose by stimulating insulin secretion (32). The same may be true for other insulin secretagogues such as exendin 4 or dipeptidylpeptidase IV inhibitors.

The results obtained during metformin are in accordance with previous observations demonstrating that the effect of the drug on insulin sensitivity is small (33). Recent studies suggest that its main mechanism of action is the inhibition of the hepatic glucose production (34). A limitation of this report is that the methods used here are not able to detect changes on the hepatic glucose production. This problem might be surpassed using the euglycemic hyperinsulinemic clamp. However, the complexity of this procedure makes it almost impossible to repeat it 6 times as required by the study design. In spite of this constraint, the data reported here provide new information about the mechanisms by which metformin increases the hypoglycemic effects of glyburide.

The metabolic actions of metformin seem to be explained by increased activity of the AMP-activated protein kinase (AMPK) (35), a major cellular regulator of lipid and glucose metabolism. The activation of this enzyme decreases the activity of the acetyl-CoA carboxylase which results in increased fatty acid oxidation and decreased lipogenesis in the liver, skeletal muscle and fat. Decreased lipogenesis may be related also to lower expression and activity of SREBP-1 induced by AMPK. This enzyme is expressed in the β -cells leaving the possibility that its activation modulates insulin secretion. *In vitro* studies show that the effect of AMPK activation is inhibition of insulin release at low glucose concentrations (36). Consequently, the current evidence

does not provide a link for the effects on insulin secretion reported here and the AMPK activation.

Information about the long-term effects of the combination is required. Results suggest that its use is associated with an increased mortality (5, 37). However, compared to the controls, patients using the combination were younger, had suffered diabetes for a longer time and their FPG was higher. Increased mortality could be a consequence of a selection bias rather than an adverse effect of the medication. A *post hoc* analysis of the Bezafibrate Infarction Prevention study suggests that combined treatment is associated with an increased hazard ratio for all cause mortality of 1.53 (95% CI 1.2-1.96), even after adjusting for several possible confounder variables (38). It is clear that randomized controlled trials are necessary to study the long-term effects of the combination of metformin and sulfonylureas.

In conclusion, the data reported here confirm that the combination glyburide/metformin has more potent hypoglycemic effects than those observed by the single use of any of these drugs. Additive effects on stimulating insulin secretion are the main explanation for the greater efficacy of the combined treatment. Increased insulin sensitivity is not the mechanism by which the combination exerts its greater hypoglycemic effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from Silanes Laboratories and by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and Secretaría de Salud for A. Guliás-Herrero MD, PhD.

REFERENCES

1. Schenn A.J., Lefevre P.J.: Management of the obese diabetic patient. *Diabetes Res.* 7: 77-93, 1999.
2. Riddle M.C.: Overview of current therapeutic options. *Diabetes Care* 22: 76-78, 1999.
3. Bailey C.J., Turner R.C.: Metformin. *N. Engl. J. Med.* 334: 574-579, 1996.
4. Bell P.M., Haden D.R.: Metformin. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 26: 523-537, 1997.
5. United Kingdom Prospective Diabetes Study Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 837-853, 1998.
6. United Kingdom Prospective Diabetes Study Group: A randomized trial of efficacy of early addition of metformin

- in sulfonylurea - treated type 2 diabetes (UKPDS 28). *Diabetes Care* 21: 87-92, 1998.
7. Riddle M.: Combining sulfonylureas and other oral agents. *Am. J. Med.* 108 (6A): 15S-22S, 2000.
 8. Rull J.A.: Cloropropamida-metformin en diabéticos obesos o con falla secundaria a sulfonilureas. Resultados a largo plazo. *Prensa Méd. Mex.* 94: 3-8, 1969.
 9. De Fronzo R.A., Goodman A.M., and the Multicenter Metformin Study Group. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 333: 541-549, 1995.
 10. Reaven G.M., Johnston P., Hollenbeck C.B., Skowronski R., Zhang J.C., Goldfine I.D., Chen Y.D-I.: Combined metformin-sulfonylurea treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes in fair to poor glycemic control. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 1020-1026, 1992.
 11. Raptis A.E., Tountas N.B., Yalouris A.G., Halvatsiotis P.G., Raptis S.A.: Therapeutic effect of glibenclamide in a fixed combination with metformin or phenformin in NIDDM patients. *Horm. Metab. Res.* 28: 89-94, 1996.
 12. Franz M.J., Horton E.D., Bantle J.P.: Nutrition principles for the management of diabetes and related complications. *Diabetes Care* 17: 490-518, 1994.
 13. Quelch S., Gebhart S.S.P., Bergman R.N., Phillips L.S.: Minimal model analysis of intravenous glucose tolerance test-derived insulin sensitivity in diabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:1508-1518, 1990.
 14. Matsuda M., De Fronzo R.A.: Insulin sensitivity index obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 22: 1462-1470, 1999.
 15. MacLean P., Vadlamudi S., MacDonald K., Pories W., Houmar J., Barakat H.: Impact of insulin resistance on lipoprotein subpopulation distribution in lean and morbidly obese nondiabetic women. *Metabolism* 49: 285-292, 2000.
 16. Aguilar-Salinas C.A., Reyes E., Ordoñez M.L., Arellano-Torres M., Ramírez-Jiménez S., Domínguez-López A., Martínez-Francois J.R., Velasco-Pérez M.L., Alpizar M., García-García E., Gómez-Pérez F.J., Rull J.A., Tusié-Luna M.T.: Early onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the Mexican population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 220-226, 2001.
 17. Rains S.G.H., Wilson G.A., Richmow W., Elkeles R.S.: The effect of glibenclamide and metformin on serum lipoproteins in type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 5: 653-658, 1988.
 18. Abbasi F., Kamth V., Rizvi A.A., Carantoni M., Chen Y-D., Reaven G.: Results of a placebo-controlled study of the metabolic effects of the addition of metformin to sulfonylurea-treated patients. *Diabetes Care* 20: 1863-1869, 1997.
 19. Hermann L.S., Schertén B., Bitzén P.O., Kjellström T., Lingärde F., Melander A.: Therapeutic comparison of metformin and sulfonylurea, alone and in various combinations. A double-blind controlled study. *Diabetes Care* 17: 1100-1109, 1994.
 20. Tripathy D., Carlsson M., Almgren P., Isomaa B., Taskinen M.R., Tuomi T., Groop L.C.: Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance. Lessons from the Botnia study. *Diabetes* 49: 975-980, 2000.
 21. Saad M., Anderson R., Laws A.: A comparison between the minimal model and the glucose clamp in the assessment of insulin sensitivity across the spectrum of glucose tolerance: for the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 43: 1114-1121, 1994.
 22. Mather K., Hunt E., Steinberg H.: Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: Implications for research applications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 5457-5464, 2001.
 23. Patane G., Piro S., Rabuazzo A.M., Anello M., Vigneri R., Purrello F.: Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose. *Diabetes* 49: 735-740, 2000.
 24. Lupi R., Del Guerra S., Fierabracci V., Marselli L., Novelli M., Patane G., Boggi U., Mosca F., Piro S., Del Prato S., Marchetti P.: Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes* 51 (Suppl. 1): S134-S137, 2002.
 25. Lupi R., Marchetti P., Giannarelli R., Coppelli A., Tellini C., Del Guerra S., Lorenzetti M., Carmellini M., Mosca F., Navalesi R.: Effects of glibenclamide and metformin (alone or in combination) on insulin release from isolated human pancreatic islets. *Acta Diabetol.* 34: 46-48, 1997.
 26. Lupi R., Del Guerra S., Tellini C., Giannarelli R., Coppelli A., Lorenzetti M., Carmellini M., Mosca F., Navalesi R., Marchetti P.: The biguanide compound metformin prevents desensitization of human pancreatic islets induced by high glucose. *Eur. J. Pharmacol.* 8: 205-209, 1999.
 27. Zhou Y.P., Berggren P.O., Grill V.E.: A fatty acid-induced decrease in pyruvate dehydrogenase activity is an important determinant of beta cell dysfunction in the obese diabetic db/db mouse. *Diabetes* 45: 580-586, 1996.
 28. Zhou Y.P., Grill V.E.: Palmitate-induced beta cell insensitivity to glucose is coupled to decreased pyruvate dehydrogenase activity and enhanced kinase activity in rat pancreatic islets. *Diabetes* 44: 394-399, 1995.
 29. Gregorio F., Ambrosi F., Manfrini S., Santucci A., Filipponi P.: Metformin, plasma glucose and free fatty acids in type II diabetic out-patients: results of a clinical study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 37: 21-33, 1997.
 30. Ashcroft F.M., Friddle F.M.: ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42: 903-919, 1999.
 31. Levy J., Atkinson A.B., Bell P.M., McCance D.R., Hadden D.R.: Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study. *Diabet. Med.* 15: 290-296, 1998.
 32. Zander M., Taskiran M., Toft-Nielsen M.B., Madsbad S., Holst J.J.: Additive glucose-lowering of glucagon-like peptide-1 and metformin in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24: 720-725, 2001.

33. Morel Y., Golay A., Perneger T., Lehmann T., Vadas L., Pasik C., Reaven G.M.: Metformin treatment leads to an increase in basal, but not insulin-stimulated, glucose disposal in obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabet. Med.* 16: 650-655, 1999.
34. Song S., Andrikopoulos S., Filippis C., Thorburn A.W., Khan D., Proietto J.: Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am. J. Physiol.* 281: E275-E282, 2001.
35. Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N., Hirschman M.F., Goodyear L.J., Moller D.E.: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108: 1167-1174, 2001.
36. Winder W.W., Hardie D.G.: AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* 277: E1-E10, 1999.
37. Olsson J., Lindberg G., Gottsater M., Lindwall K., Sjosstrand A., Tisell A., Melander A.: Increased mortality in type 2 diabetic patients using sulphonylurea and metformin combination: a population-based observational study. *Diabetologia* 43: 558-560, 2000.
38. Fisman E.Z., Tenenbaum A., Boyko V., Benderly M., Adler Y., Friedensohn A., Kohanovski M., Rotzak R., Schneider H., Behar S., Motro M.: Oral antidiabetic treatment in patients with coronary disease: time-related increased mortality on combined glyburide/metformin therapy over a 7.7 year follow up. *Clin. Cardiol.* 24: 151-158, 2001.