



*Universidad Nacional
Autónoma de México*

*Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"Zaragoza"*

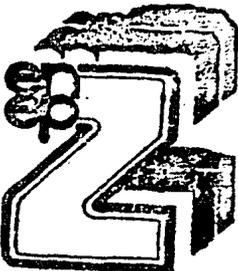
*ESTUDIOS DE UNION DE INSULINA A SU
RECEPTOR EN NIÑOS CON DIABETES ME-
LLITUS INSULINO-DEPENDIENTE (TIPO I)*

T E S I S

*Que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo*

P r e s e n t a

Maria Esther Muriel Argüelles Sánchez



México, D. F.

Marzo 1985



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.

INDICE

Capítulo 1. INTRODUCCION	
1.1. Receptores de membrana.....	1
1.2. Receptor de insulina	8
1.3. Diabetes mellitus	14
1.3.1. Receptor de insulina en Diabetes	16
1.4. Fundamento del radioanálisis.....	18
de receptores.	
Capítulo 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
Capítulo 3. OBJETIVOS	21
Capítulo 4. HIPOTESIS	22
Capítulo 5. MATERIAL Y METODOS	23
5.1. Equipo	23
5.2. Material	23
5.3. Reactivos	24
5.4. Material biológico.....	25
5.5. Métodos	26
5.5.1. Preparación de amortiguador de in_	26
cubación.	
5.5.2. Obtención de los eritrocitos	26
5.5.3. Estandarización del radioanálisis	27
de receptores.	
5.5.3.1. Concentración de células	27
5.5.3.2. Efecto de la temperatura y del	28
tiempo de incubación.	
5.5.3.3. Efecto del pH	28
5.5.3.4. Ajuste de condiciones	29
5.5.3.5. Radioanálisis de receptores	29
5.5.4. Estudios en pacientes diabéticos	30
insulino-dependiente.	
5.5.4.1. Toma de muestra	30
5.5.4.2. Estudios de unión	32
5.5.4.3. Determinación de glucosa	32

5.5.4.4.	Determinación de insulina	32
5.5.4.5.	Determinación de hemoglobina glucosilada:	32
5.5.5.	Métodos estadísticos	33
5.5.5.1.	Cálculo del porcentaje de unión en radioanálisis de receptores. ...	33
5.5.5.2.	Cálculo de coeficientes de variación intra e interensayo del método de radioanálisis de receptores. ..	33
5.5.5.3.	Estudios de sensibilidad del método.	34
5.5.5.4.	Cálculo del número de receptores ..	35
5.5.5.5.	Cálculo de afinidad y ocupación ...	36
5.5.5.6.	Análisis discriminante	37
Capítulo 6.	RESULTADOS	39
6.1.	Estandarización del radioanálisis de receptores.	39
6.1.1.	Concentración de células	39
6.1.2.	Efecto de la temperatura y tiempo de incubación. ...	41
6.1.3.	Efecto del pH	46
6.1.4.	Ajuste de condiciones	48
6.1.5.	Radioanálisis de receptores	50
6.2.	Resultados de estudios en diabéticos insulino-dependiente. ..	52
6.2.1.	Obtención de los eritrocitos	52
6.2.2.	Estudios de unión	52
6.2.2.1.	Curvas de desplazamientos	54
6.2.2.2.	Análisis de Scatchard	54
6.2.3.	Hemoglobina glucosilada, glucosa e insulina.	56
6.2.4.	Resultados de correlación	60
6.2.5.	Análisis discriminante	60
Capítulo 7.	DISCUSION DE RESULTADOS	65
Capítulo 8.	CONCLUSIONES	71
Capítulo 9.	BIBLIOGRAFIA	74.

1. INTRODUCCION

1.1. Receptores de membrana

El término hormona fué utilizado por primera vez en 1904 por William Bayliss y Ernest Starling para describir la acción de la secretina, una molécula segregada por el duodeno que estimula el flujo de jugo pancreático. De este trabajo surgió el concepto de que las hormonas son moléculas que se sintetizan en tejidos específicos (glándulas) y se segregan directamente en la sangre que las transporta a su lugar de acción, los órganos blanco ó células blanco. En éstos, las hormonas pueden ejercer sus efectos específicos de tres maneras: influyendo sobre la velocidad de la síntesis de enzimas y proteínas; afectando la velocidad de la catálisis enzimática y alterando la permeabilidad de las membranas celulares (1).

De los estudios realizados sobre acción hormonal en las últimas tres décadas, se probó que las células blanco que responden a una determinada hormona contienen receptores hormonales específicos que están compuestos en su mayor parte por proteínas pero también pueden contener carbohidratos ó lípidos (2), los receptores unen a la hormona con gran afinidad y alta especificidad. El número de receptores por célula varía desde 500 a 250 000 y células muy especializadas pueden tener más de un billón (3).

Se ha propuesto que existen básicamente dos tipos de receptores hormonales: los intracelulares; para hormonas que por su naturaleza liposoluble pueden pasar a través de la membrana como es el caso de las hormonas esteroideas que poseen receptores citoplasmáticos (4) y las hormonas tiroideas que tienen receptores nucleares (5); el otro tipo corresponde a los receptores de membrana para hormonas que por su naturaleza hidrosoluble no pasan a través de la membrana celular.

Existen evidencias que sugieren que las hormonas polipeptídicas y los neurotransmisores poseen receptores de membrana. Pastan y colaboradores en 1966, demostraron que el efecto biológico de una hormona peptídica se abolfa si el tejido se ponía en contacto con anticuerpos a la hormona, esto sugiere que para ejercer su efecto biológico la hormona debe unirse a la membrana celular (6). Una conclusión similar fué hecha por Cuatrecasas en 1969, al demostrar que las hormonas enlazadas covalentemente a polímeros inertes (celulosa, sepharosa), retienen su actividad biológica (7). Una tercera evidencia, fué aportada por Kono en 1972, quién halló que la digestión del adipocito con tripsina resulta en una pérdida de la respuesta celular a la hormona, esto sugirió que la tripsina destruye un componente peptídico en la superficie celular necesario para la acción hormonal (6). Aunque estos estudios han sido cues-

tionados en los últimos años (8), estas observaciones evidencian que la hormona no necesita entrar a la célula para ejercer su efecto biológico. En base a estos hechos y al descubrimiento del AMP cíclico (cAMP) realizado por Sutherland y colaboradores en 1950, se propone la hipótesis del segundo mensajero, como un modelo de la acción hormonal (Figura No. 1). De acuerdo a este modelo, las hormonas peptídicas y los neurotransmisores se unen a receptores de membrana, ésta unión activa un sistema efector que genera el "segundo mensajero" intracelular de acción hormonal. Así las hormonas pueden regular los procesos metabólicos de la célula sin entrar en ella. En muchos casos el sistema efector es la enzima adenil-ciclasa y el segundo mensajero el cAMP (6). Para comprender mejor este modelo, se relacionaron los receptores hormonales de membrana con el modelo de membrana de mosaico fluido propuesto en 1972, por Singer y Nicholson. En este modelo, la membrana está compuesta de dos capas de proteína, dispersas entre una bicapa fluida de lípidos. Algunas de estas proteínas se extienden a través de la bicapa, mientras que otras se encuentran parcialmente embebidas en/ó sobre la superficie de la membrana. Algunos componentes de la membrana permanecen relativamente inmóviles, mientras que otras son capaces de difundir rápido y lateralmente. La hipótesis de que la membrana fluida

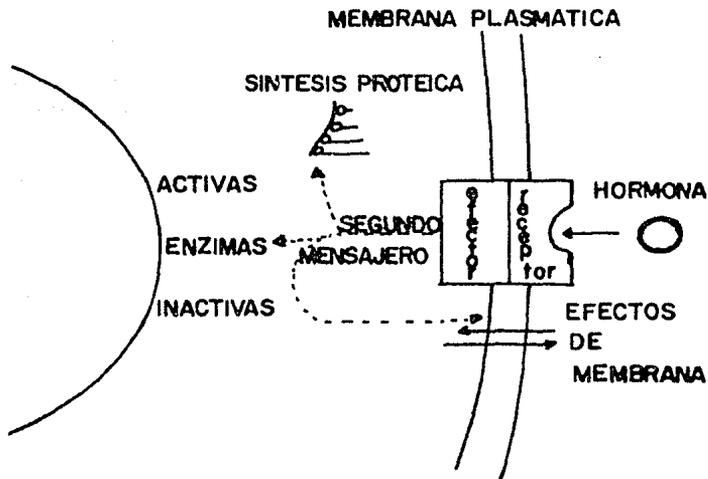
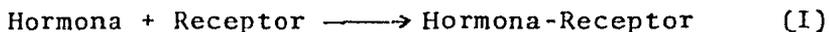
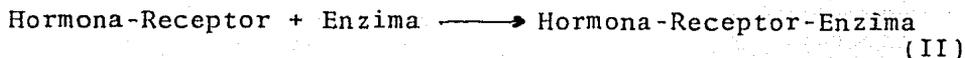


Figura No. 1. Modelo de acción general para hormonas peptídicas y neurotransmisores.

juega un papel importante en la activación hormonal fué originalmente propuesto por Singer y Nicholson en 1972 y ha sido ampliado por Perkins en 1973 y Cuatrecasas en 1974. En este modelo (Figura No. 2), el receptor hormonal y el efector se encuentran separados como componentes integrales de la membrana y son capaces de difundir lateralmente. Entonces la activación hormonal de una célula es el resultado de dos pasos secuenciales:



que ocurre en la superficie de la membrana y



que ocurren dentro de la membrana para dar lugar a la generación del segundo mensajero (2,9).

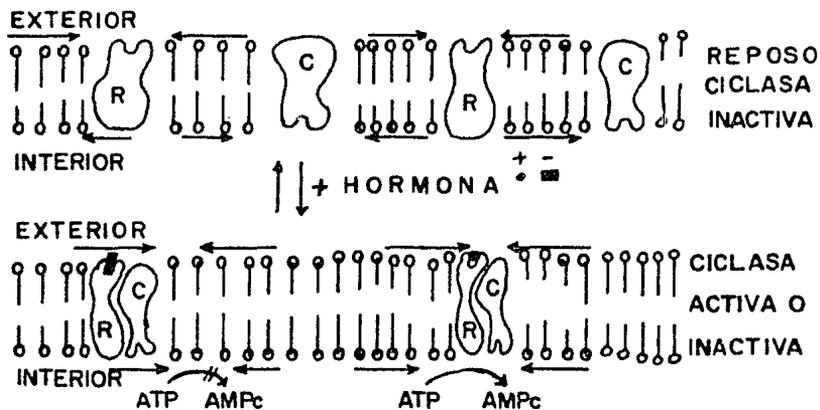


Figura No. 2. Mecanismo de modulación de la actividad de la adenil-ciclase por hormonas en la membrana celular.

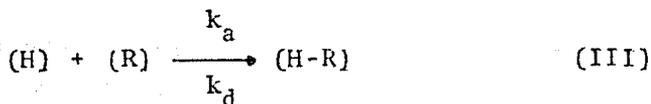
Posteriormente Kahn en 1976, enumera las características de la unión hormona-receptor que se describen a continuación:

1. La unión de la hormona a su receptor es rápida y reversible. El tiempo de unión de hormona a su receptor depende de la temperatura y de las concentraciones de hormona y receptor.

La adición de un exceso de hormona no marcada, la dilución de la mezcla de reacción o el cambio en

el pH, resulta en una rápida disociación de la hormona marcada.

2. Existe un número finito de sitios receptores sobre la célula.
3. Los sitios de unión son específicos para la hormona y la unión de la hormona a estos sitios está relacionada con los efectos biológicos de la misma, esto es, un receptor hormonal une solo un tipo de hormona. Experimentalmente se ha demostrado que la potencia relativa de análogos de la hormona para competir por los sitios de unión está en proporción directa a su actividad biológica.
4. Los receptores hormonales tienen una alta afinidad por la hormona. Una gran variedad de métodos matemáticos se han aplicado en el análisis de datos de unión para llegar a constantes de afinidad en la interacción hormona-receptor. La mayoría de estos análisis se basa en que la interacción hormona-receptor está en equilibrio bimolecular reversible:



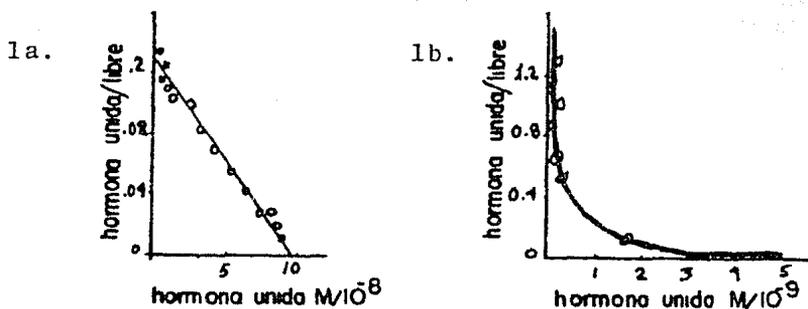
y

$$\frac{k_a}{k_d} = \frac{(H-R)}{(H) (R)} = K \quad (IV)$$

donde (H) es la concentración de la hormona libre, (R) es la concentración de receptores no ocupados, (H-R) es la concentración de complejos hormona-receptor, k_a y k_d son constantes de asociación y disociación respectivamente y K es la constante de equilibrio ó constante de afinidad para la reacción. La mayoría de receptores hormonales tienen constantes de afinidad entre 10^8 y 10^{10} M^{-1} (2,10).

Se sabe también que el receptor hormonal puede tener dos ó más subunidades pequeñas capaces de unir a la hormona y que pueden interactuar entre sí en forma cooperativa, ya sea positiva ó negativa. En 1973, De Meyts propone que la cooperatividad es positiva, si al aumentar la ocupancia del receptor aumenta la afinidad y que la cooperatividad es negativa si al aumentar la ocupancia del receptor disminuye su afinidad (11,12). Existe una forma de representar gráficamente este tipo de interacciones, mediante el análisis de Scatchard (13), si la cooperatividad es positiva se obtiene una recta (Gráfica 1a.) y si la cooperatividad es negativa es curvilínea (Gráfica 1b). Este tipo de interacciones (cooperatividad positiva y cooperatividad negativa), pueden explicarse por el modelo concertado de interacciones alostéricas propuesto por Jacques Monod, Jeffrís Wyman y Jean-Pierre Changeux en 1965 ó por el modelo secuencial de interacciones alosté-

ricas desarrollado por Daniel Koshland Jr. (1).



Gráficas de Scatchard. Cooperatividad positiva (1a)
Cooperatividad negativa (1b).

1.2. Receptor de Insulina

La proposición de que el receptor de insulina está localizado en la membrana celular, fué expresada por Levine en 1949, en base a que esta hormona facilita el transporte transmembranal de glucosa en una variedad de tejidos extrahepáticos, como son músculo estriado, músculo cardíaco y tejido adiposo. La primera evidencia de la unión de insulina a tejidos sensitivos fué hecha por Stadie en 1949, quién observó que diafragmas de rata incubados con insulina y lavados posteriormente mostraron un incremento en la síntesis de glucógeno (9). En 1969 Cuatrecasas indica que el primer paso para la acción de la insulina es la interacción con su receptor en la membrana celular (7). Actualmente se ha demostrado que un gran número de células y tejidos poseen receptores para

insulina, entre éstos se encuentran, el adipocito (14,15), el hepatocito (16,17) y monocito (18). Estudios recientes demostraron que los eritrocitos de diferentes especies animales incluyendo al hombre, poseen receptores específicos para insulina (19-23). Al tratar de aislar el receptor de insulina, de éstas células, se ha visto que éste retiene su capacidad de unión y reactividad inmunológica cuando se solubiliza en detergentes como el Tritón X-100* y puede ser posteriormente caracterizado, Gavin en 1972, Cuatrecasas en 1972, Harrison en 1978, Ginsberg en 1976, Maturó y Hollenberg en 1978, lo caracterizaron por filtración en gel y más recientemente Krupp y Levingston en 1978 y Lang en 1980 por electroforesis en gel (24). Im en 1983, aisló el receptor de insulina del eritrocito humano por extracción con Tritón X-102* y lo caracterizó por electroforesis en gel (25).

Todos estos estudios permitieron concluir que el receptor de insulina que se localiza en la membrana celular, es una glucoproteína de peso molecular entre 310 y 350 K, probablemente un heterotetrámero simétrico compuesto de dos cadenas alfa ($PM \approx 135K$) y dos cadenas beta ($PM \approx 45K$). Aunque otros autores sugieren que está compuesto de dos cadenas alfa ($PM \approx 125 K$) y dos cadenas beta ($PM \approx 90K$), en la configuración (β -S-S- α)-S-S-(α -S-S- β) cuya

* Marca Registrada.

estructura semeja a una inmunoglobulina (24,26). Ambas subunidades del receptor de insulina contribuyen en la unión de hormona (Figura No. 3a) (24).

La insulina es una hormona sintetizada en las células beta del páncreas, cuya estructura es conocida desde 1954, cuando Fredrick Sanger mostró que constaba de dos cadenas la A de 21 residuos de aminoácidos y la B de 30 (27).

Blundell en 1972, propuso que el sitio bioactivo de la insulina para efectos metabólicos (Figura No. 3b) se encontraba en las regiones C-terminal y N-terminal de la cadena A y la parte distal de la cadena B (24).

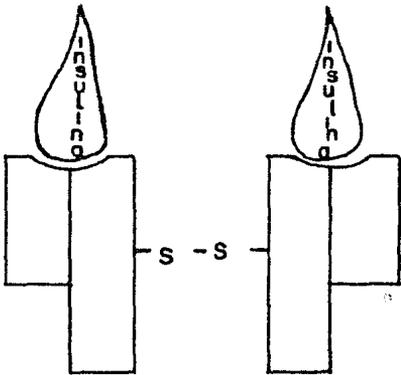


Figura 3a.

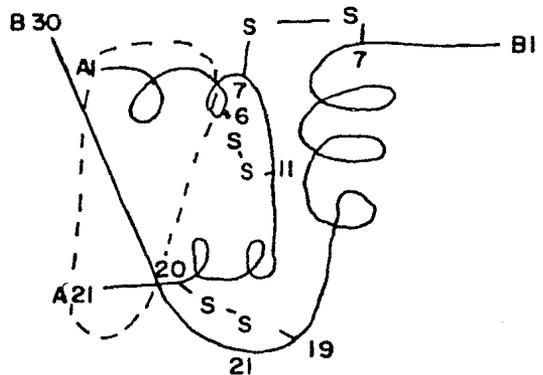


Figura 3b.

Figura No. 3. Representación esquemática del receptor de insulina (3a). Esquema de la insulina, la línea punteada indica el sitio bioactivo para efectos metabólicos (3b).

Kahn en 1979, sugiere dos modelos generales de acción para la insulina. El primero es semejante al mecanismo de acción para las hormonas polipeptídicas (Figura No. 4), donde la insulina se une a su receptor, ésta unión activa un sistema efector que genera "el segundo mensajero" intracelular de acción hormonal. Jarett y Lerner en 1979 y 1980 respectivamente, presentaron evidencias de la existencia del segundo mensajero, sin embargo, la estructura química de éste no se conoce (24).

Para el segundo mecanismo de acción (Figura No. 4), se propone que la insulina entra a la célula y ella misma actúa como segundo mensajero intracelular, este proceso se conoce como internalización que se inicia cuando la insulina presente en la membrana plasmática forma el complejo hormona-receptor que entra a la célula por pinocitosis, donde interactúa con receptores intracelulares y finalmente es degradada. El sitio donde permanece la insulina después de que es internalizada ha sido motivo de debate, habiéndose localizado en lisosomas, aparato de Golgi y membrana nuclear (24).

El receptor de insulina posee las mismas propiedades de unión que se mencionaron para los receptores de membrana. Mediante el análisis de Scatchard se obtiene una línea curva (Figura 1b) lo que según De Meyts obedece a una cooperatividad negativa (11,12) ó según Herzberg a

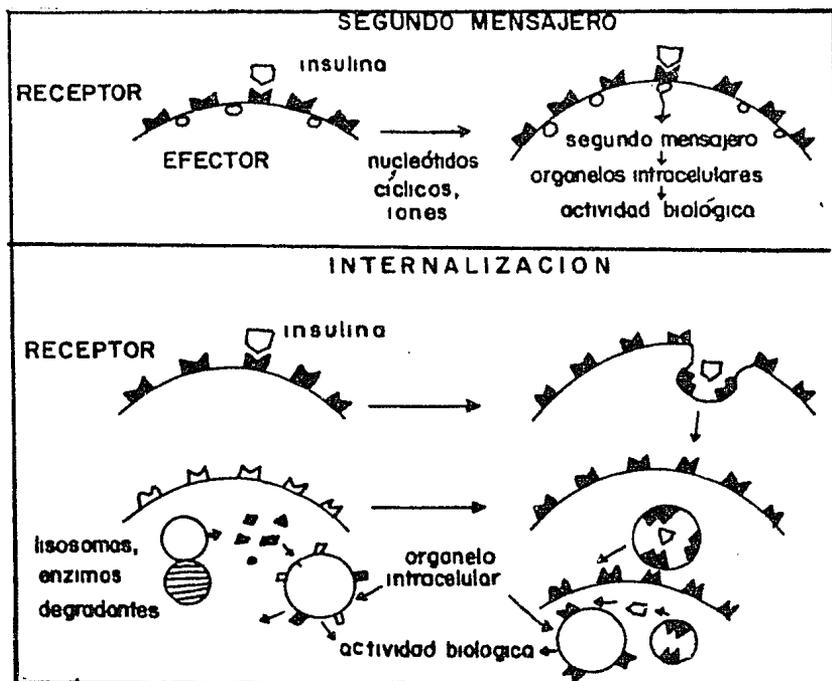


Figura No. 4. Modelos generales de la acción de insulina.

que existen dos clases de receptores con diferente afinidad (28), De Lean y Rodbard, proponen una combinación de cooperatividad negativa y sitios de unión heterógeneos (24). Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado purificar dos poblaciones de receptores con diferente afinidad ya que éstos pierden sus características de unión en el procedimiento de purificación, por lo que el modelo de cooperatividad, se utiliza aún para comparar afinidad del receptor bajo diferentes estados fisiopatológicos (24).

Reportes de Gavin en 1974 y de Blackard en 1978, demuestran que la exposición del receptor de insulina

(cultivos de células) a altas concentraciones de hormona muestran una disminución en el número de receptores, fenómeno llamado "regulación a la baja" (29,30). En general, los cambios en la afinidad del receptor se observan bajo condiciones que se caracterizan por alteraciones metabólicas que ocurren usualmente en horas, mientras que el cambio en el número de receptores sólo sucede en condiciones crónicas que van de semanas a meses (31,32).

Se han descrito alteraciones en la unión de la insulina a su receptor en diversas enfermedades como la acromegalia (33), tumores secretores de insulina (34), diabetes mellitus tipo I y II (35-37), obesidad (38), acantosis nigricans y resistencia a la insulina (39).

La historia de la diabetes se remonta alrededor del año 1500 A.C. en Egipto, donde en el papiro Ebers se menciona la poliuria que es un síntoma clásico de la diabetes. Sushrutha en la India 400 años A.C. notó la orina dulce, pero no supo a que atribuirlo. En el primer siglo de la era cristiana, Celsus realizó la primera descripción clínica de la enfermedad y el médico romano Aretaeus le da el nombre de "diabetes" que significa sifón, ya que se decía que la vida se les escapaba por la orina. Avicena, 1000 años A.C., médico árabe, da una buena descripción de la diabetes donde incluye complicaciones de la enfermedad entre ellas la gangrena. Posteriormente Thomas Willis (muerto en 1675), observó que la orina de los diabéticos era "sorprendentemente dulce" y Dobson en 1775 demostró que esa dulzura era debido al azúcar, por lo cual Rollo un poco antes de 1800, describe un régimen dietético limitado en carbohidratos, alto en proteínas y alto en grasas. En 1869, Langerhans logra un gran adelanto al descubrir los islotes secretores de la insulina y en 1889 ocurre algo decisivo cuando Merin y Minkowski inducen diabetes en perros por pancreatemia total, con lo que se demostró que la diabetes se produce por la ausencia de una sustancia que se elaboraba en el páncreas.

Faltaba aislar dicha sustancia y esto sucedió en 1921 cuando Banting y Best extraen de páncreas la insulina, que se utilizó en el tratamiento del paciente diabético, logrando así el control de la enfermedad (40).

A la fecha se sabe que la Diabetes mellitus es un síndrome con desórdenes del metabolismo e hiperglucemia, debido a una deficiencia en la secreción de la insulina ó a una reducción de su efecto biológico. Recientemente el National Institute of Health, decidió cambiar la clasificación "funcional" de diabetes basada en características de la secreción de insulina ó sensibilidad a la insulina, por la clasificación "terapéutica" que ha sido adoptada por la American Diabetes Association (41).

TABLA No. 1. Clasificación clínica de los síndromes de Diabetes mellitus .

TIPO	CETOSIS	ANTICUER POS VS. ISLOTES	RELACION CON HLA.
(I) Insulino-dependiente (IDDM)	Presente	Presente	Positiva
(II) No insulino-dependiente (NIDDM)	Presente	Ausente	Negativa
(a) No obeso			
(b) Obeso			

1.3.1. Receptor de Insulina en Diabetes.

En 1975, Hepp al evaluar la unión de insulina a su receptor en hamster diabéticas, encontró aumento en la unión que asoció con un aumento en el número de receptores de insulina. También observó correlación entre el número de receptores y la concentración de insulina (42). Posteriormente en 1977, Freytchet observó que con el tratamiento con estreptozotocina en ratones obesos, hiperglucémicos e hiperinsulinémicos, produce una disminución de los niveles de insulina plasmática y un aumento del número de receptores (43). Henry en 1977, reportó que los diabéticos insulino-dependiente bien controlados tenían niveles de glucosa normales con sensibilidad normal a la insulina (44). Un año más tarde, Pedersen no encontró diferencias de unión entre pacientes diabéticos insulino-dependiente bien controlados y el grupo normal y reportó un cambio en la unión en pacientes con IDDM recién diagnosticados. Tampoco encontró correlación alguna entre la unión de insulina a su receptor y la concentración de insulina plasmática (45). En 1980, Kappy evaluó la unión de insulina en adolescentes y niños con IDDM y encontró que la unión de insulina, concentración de receptores y la afinidad eran normales. No se demostró correlación entre la unión (insulina-receptor) con la duración del padecimiento, ni con el grado de control metabólico del pa

1.3.1. Receptor de Insulina en Diabetes.

En 1975, Hepp al evaluar la unión de insulina a su receptor en hamster diabéticas, encontró aumento en la unión que asoció con un aumento en el número de receptores de insulina. También observó correlación entre el número de receptores y la concentración de insulina (42). Posteriormente en 1977, Freytchet observó que con el tratamiento con estreptozotocina en ratones obesos, hiperglucémicos e hiperinsulinémicos, produce una disminución de los niveles de insulina plasmática y un aumento del número de receptores (43). Henry en 1977, reportó que los diabéticos insulino-dependiente bien controlados tenían niveles de glucosa normales con sensibilidad normal a la insulina (44). Un año más tarde, Pedersen no encontró diferencias de unión entre pacientes diabéticos insulino-dependiente bien controlados y el grupo normal y reportó un cambio en la unión en pacientes con IDDM recién diagnosticados. Tampoco encontró correlación alguna entre la unión de insulina a su receptor y la concentración de insulina plasmática (45). En 1980, Kappy evaluó la unión de insulina en adolescentes y niños con IDDM y encontró que la unión de insulina, concentración de receptores y la afinidad eran normales. No se demostró correlación entre la unión (insulina-receptor) con la duración del padecimiento, ni con el grado de control metabólico del pa

ciente. Estos autores sugirieron que las alteraciones en la unión de insulina a células, probablemente tenga muy poco que ver con la insulina exógena ó con el control metabólico de glucosa en condiciones basales (46). Posteriormente en 1981, Dons demostró que la unión de insulina en monocitos y eritrocitos en pacientes con IDDM en mal control metabólico se encontró aumentada ó normal (47). En 1981, Fantus obtuvo resultados heterogéneos en la unión de insulina a su receptor en diabéticos insulino-dependiente en mal control metabólico (35). Mas tarde, en 1982, Okamoto encontró que la unión de insulina en hepatocito y eritrocito aumenta debido a un incremento en la concentración del receptor y con la afinidad del receptor en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina sin encontrar correlación entre la unión y la concentración plasmática de insulina (48).

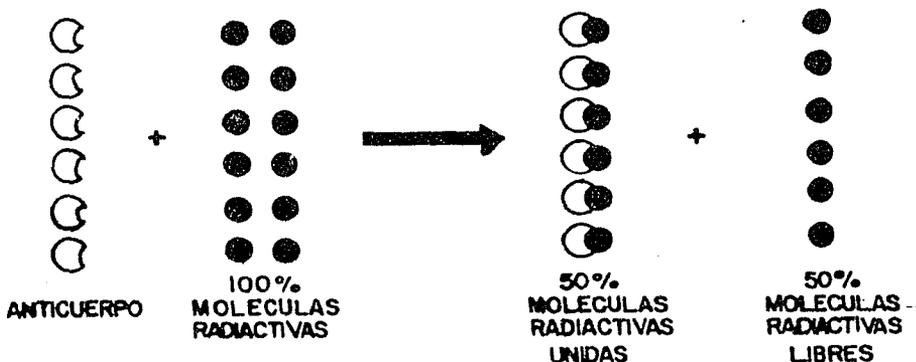
1.4. Fundamento del Radioanálisis de Receptores

La metodología que se utiliza para el estudio de la interacción hormona-receptor es el radioanálisis de receptores, que trabaja bajo los mismos principios del radioinmunoanálisis (49).

El punto esencial es el enlazamiento reversible de un compuesto (Sx) a una proteína específica de acuerdo a la ley de acción de masas:

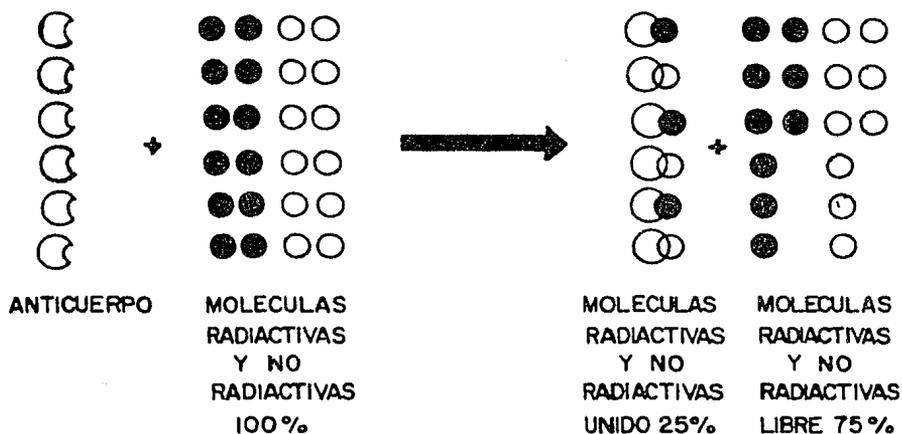


Para la estimación radioinmunológica de un compuesto Sx, se utilizan anticuerpos específicos contra este compuesto (antígeno) y la adición de una cierta cantidad de anticuerpo a un exceso de antígeno marcado (Sx*) nos da la siguiente reacción:



En equilibrio, parte de las moléculas de antígeno, son enlazadas a los anticuerpos, el resto está libre, porque los sitios de enlace son limitados.

Cuando un exceso de moléculas radiactivas antígeno Sx^* y moléculas antígeno no marcadas Sx se mezclan, ambas compiten por el sitio de enlace disponible para una cantidad definida del anticuerpo:



Si se agrega más antígeno no marcado Sx , se van a encontrar menos moléculas radiactivas unidas al anticuerpo.

Después de cierto tiempo de incubación el anticuerpo unido se separa de la fracción libre y se miden las moléculas radiactivas unidas al anticuerpo en un espectrofotómetro de centelleo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aún cuando hay un gran número de estudios sobre receptores de insulina, nuestro país no cuenta con una metodología al respecto, por lo que la implementación del radioanálisis de receptores de insulina en eritrocitos humanos es de vital importancia ya que nos permitirá estudiar la cinética de unión de insulina a su receptor en niños con diabetes mellitus insulino-dependiente (tipo I), lo que además redundará en un mejor conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Desarrollar y estandarizar el radioanálisis de receptores de insulina en eritrocitos humanos.

- 3.2. Estudiar la cinética de unión de insulina a su receptor en niños con diabetes mellitus insulino-dependiente en buen y mal control metabólico.

4. HIPOTESIS

Se sabe que la insulina interactúa con su receptor para ejercer su efecto biológico y que si no hay ninguna alteración a nivel de prerreceptor, receptor y postreceptor, el metabolismo en un individuo sano es normal. En el diabético insulino-dependiente el metabolismo cambia con el grado de control que se tenga de la enfermedad. Por lo que se propone que la interacción de insulina a su receptor se modifica con el grado de control metabólico en niños con diabetes mellitus insulino-dependiente.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Equipo

5.1.1. Espectrofotómetro de centelleo. Modelo 5120. Packard, U.S.A.

5.1.2. Centrífuga refrigerada. Modelo IEC PR-J600. Damon/IEC, División, U.S.A.

5.1.3. Micropipetas Justor 1100. Stockwell Scientific. Modelos 1100-1000, 1100-500, 1100-250, 1100-200, 1100-100, 1100-50, 1100-25, 1100-10. U.S.A.

5.1.4. Microscopio. Modelo 339 685. Reichert, Austria.

5.1.5. Potenciómetro Expandomatic SS-2. Beckman Instruments Inc. Scientific Instruments. U.S.A.

5.1.6. Cámara de Neubauer Bright Line. Superior, Germany.

5.2. Material

5.2.1. Tubos de poliestireno 12 x 75 mm especiales para radioinmunoanálisis. Stockwell Scientific.

5.2.2. Tubos de centrifuga Pyrex. U.S.A. Capacidad de 15 ml.

5.2.3. Pipetas de Thoma. Proper Manufacturing Co. Inc.
Cat. No. 1P80 y 1P81.

5.3. Reactivos

5.3.1. Estándar de insulina porcina cristalina. No. Cat.
QA132Y. Laboratorios Elly Lilly y Cía. México.

5.3.2. Insulina porcina radiactiva, marcada con ^{125}I
que tiene una vida media de 60 días. No. Cat.
NEX-104. New England Nuclear.

5.3.3. Hepes anhidro. No. Cat. H3375. Sigma Chemical
Company.

5.3.4. Tris (amortiguador). No. Cat. X167. J.T.Baker.

5.3.5. Heparina Lipo-Hepin. No. Cat. 621. Laboratorios
Riker.

5.3.6. Cloruro de calcio anhidro. No. Cat. 2389. Merck.

5.3.7. Cloruro de sodio. No. Cat. 1 064 041. Merck.

5.3.8. EDTA sal disódica. No. Cat. 8 993. J.T.Baker.

5.3.9. Cloruro de magnesio hexahidratado. No. Cat.
5 938. Mallinckrodt Chemical Works.

5.3.10. Dextrosa. No. Cat. 65 000. Sigma Chemical Com-
pany.

5.3.11. Cloruro de potasio. No. Cat. 6 858. Mallinck-
rodt Chemical Works.

5.3.12. Albúmina bovina fracción V. No. Cat. 4 503.
Sigma Chemical Company.

5.3.13. Azul de tripano. No. Cat. 10 887. Sigma Chemical Company.

5.4. Material biológico

GRUPO CONTROL: Este grupo estuvo integrado por 13 niños que se seleccionaron bajo el siguiente criterio: Hemoglobina glucosilada $< 9\%$, sin obesidad, ni anemia, de edad similar a la del grupo en estudio y sin antecedentes familiares ni personales de diabetes mellitus.

GRUPO DE PACIENTES CON IDDM: Se estudió un total de 20 pacientes controlados en la clínica de diabetes del Servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría del C.M.N. del I.M.S.S., divididos en dos subgrupos:

I) 10 pacientes en buen control metabólico.

II) 10 pacientes en mal control metabólico.

Seleccionados bajo el siguiente criterio:

Pacientes en buen control metabólico: Hemoglobina glucosilada $< 12\%$, no obesos, ni anémicos.

Pacientes en mal control metabólico: Hemoglobina glucosilada $> 12\%$, no obesos, ni

anémicos.

5.5. Métodos

5.5.1. Preparación de amortiguador de incubación, pH 8.0 en mmol/l.

Amortiguador Tris, 50; Hepes anhidro, 50; Cloruro de magnesio hexahidratado, 10; Cloruro de calcio, 10; EDTA sal disódica, 2; Dextrosa, 10; Cloruro de sodio, 50; Cloruro de potasio, 5; 1gr. de Albúmina.

5.5.2. Obtención de los eritrocitos.

Se tomaron 15 ml de sangre en tubos con heparina. La sangre se dejó en reposo por 2 horas y se separó el plasma (rico en leucocitos) con una pipeta Pasteur. Los eritrocitos se lavaron con solución salina isotónica y se centrifugaron a 1800 r.p.m. (400 x g) durante 10 minutos a 20°C, el sobrenadante se desechó al igual que la capa de leucocitos que no alcanzaron a separarse por el procedimiento anterior. Esta operación de lavado de eritrocitos se repitió hasta eliminar los leucocitos y que el sobrenadante fuera claro. Posteriormente la pastilla con los eritrocitos se resuspendió en dos partes de amortiguador de incubación (amortiguador Hepes-Tris pH 8.0) para equilibrar las células y se centrifugó nuevamente a

1800 r.p.m. durante 10 minutos a 5°C, se aspiró y desechó el sobrenadante. Los eritrocitos se resuspendieron nuevamente en amortiguador de incubación en una cámara de Neubauer se contó el número de células que contenía la suspensión (Nº eritrocitos/ml). Se determinó la viabilidad de las células por la técnica de exclusión de azul de tripano (50). A la suspensión final se le determinó hematócrito, hemoglobina e índices eritrocitarios, así como recuento de leucocitos y reticulocitos.

5.5.3. Estandarización del radioanálisis de receptores.

5.5.3.1. Concentración de células.

Los eritrocitos en concentraciones variables ($3-18 \times 10^9$ eritrocitos/ml), se incubaron con 100 pg ^{125}I -Insulina, de acuerdo con la actividad específica (51), disuelta en 100 μl de amortiguador a 37°C, durante 30 minutos en un volumen final de 2 ml. Una vez que terminó la incubación se separó la ^{125}I -Insulina libre con 2 ml de amortiguador de incubación, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se aspiró el sobrenadante, que se desechó en el material y bajo condiciones adecuadas ya que contenía radiactividad. Este procedimiento se repite dos veces más.

Se seleccionó el número de células, que presentó

un buen porcentaje de unión adecuado al estudio.

5.5.3.2. Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación.

Mil quinientos μl de suspensión de eritrocitos (15×10^9 células) fueron incubadas con 100 pg de ^{125}I -Insulina (disuelta en 100 μl de amortiguador) que se llevó a un volúmen final de 2 ml con amortiguador Hepes-Tris pH 8.0. Las temperaturas a las que se incubó inicialmente fueron 15°C , temperatura ambiente y 37°C . Los tiempos de incubación fueron de 1 a 5 horas, prolongándose para temperatura ambiente y 15°C hasta 24 horas. La separación de ^{125}I -Insulina libre se hizo como ya se mencionó.

Finalmente bajo las mismas condiciones, se incubó a 5°C con tiempos de incubación entre 1 y 24 horas.

Se seleccionó la temperatura y el tiempo de incubación donde la reacción alcanzó el equilibrio.

5.5.3.3. Efecto del pH.

Una vez establecidas las condiciones adecuadas en cuanto a número de células, temperatura y tiempo de incubación se procedió a estudiar el efecto de pH en la cinética de unión, para ello se incubaron 1 500 μl de suspensión de eritrocitos (15×10^9 células) con 100 pg de ^{125}I -Insulina, disuelta en 100 μl amortiguador de incubación a

• 5°C durante 24 horas en un volúmen final de 2 ml con amortiguador de incubación, en intervalos de pH 6.5 - 9.0 (6.5, 7.0, 7.4, 8.0 y 9.0). La ^{125}I -Insulina se separó como ya se mencionó.

Se seleccionó el valor de pH donde se encontró mayor unión.

5.5.3.4. Ajuste de condiciones.

Se incubaron cantidades de células menores de las señaladas en la sección 5.5.3.1. de 1 a 4×10^9 eritrocitos/ ml, con 100 pg de ^{125}I -Insulina (disuelta en 25 μl), a 5°C durante 24 horas en un volúmen final de 0.5 ml con amortiguador Hepes-Tris pH 8.0. Esto se realizó porque se trabajaría con una población pediátrica y el número de células que se eligió inicialmente era muy alto.

Se seleccionó el número de células menor posible, que presentó un adecuado porcentaje de unión.

5.5.3.5. Radioanálisis de receptores.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo en cuanto a número de células, temperatura, tiempo de incubación y pH, se procedió a efectuar estudios de desplazamientos a concentraciones variables de hormona no marcada ($0 - 10^5$ ng/ ml), de la siguiente forma:

Se incubó a 5°C durante 24 horas 400 μ l de la suspensión de células (2×10^9 eritrocitos en amortiguador Hepes-Tris pH 8.0), 100 pg de 125 I-Insulina (en 25 μ l de amortiguador de incubación pH 8.0) y cantidades variables de hormona no marcada (0 a 0.5×10^5 ng) en un volúmen final de 0.5 ml (Tabla No. 2). Cada punto se realizó por triplicado.

5.5.4. Estudios de pacientes diabéticos insulino-dependiente .

5.5.4.1. Toma de muestra.

Los integrantes del grupo control, se citaron a las 7:30 horas en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Pediatría del C.M.N., I.M.S.S., en ayunas, a cada uno de ellos se les tomó 20 ml de sangre que se colocó en diferentes tubos de la siguiente forma:

- 15 ml en tubos que contenían heparina (Radioanálisis de receptores).
- 2 ml en tubos que contenían EDTA al 1% (Hemoglobina glucosilada).
- 3 ml en tubos sin anticoagulante (Glucosa, Insulina).

Los pacientes en estudio fueron citados en el Laboratorio de Endocrinología a las 7:30 horas en ayunas y sin haberse aplicado la dosis de insulina, a cada uno de

Tabla No. 2. Protocolo del radioanálisis (a).

Tubo (No)	Amortiguador HEPES-Tris. Volumen V (μl) 1.	Concentración de la dil. de insulina estándar (ng/ml). 2.	Volumen de insulina estándar añadido V (μl) 3.	Concentración final de insulina estándar. (ng/ml) (b)	¹²⁵ I-Insulina. V (μl) 4.	Suspensión de eritrocitos. V (μl) 5.	Volumen final V (μl) 6.
Blanco	475	0	0	0	25	0	500
2	75	0	0	0	25	400	500
3	25	0.001	50	0.1	25	400	500
4	50	0.01	25	0.5	25	400	500
5	25	0.01	50	1.0	25	400	500
6	65	0.1	10	2.0	25	400	500
7	50	0.1	25	5.0	25	400	500
8	25	0.1	50	10.0	25	400	500
9	50	1	25	50.0	25	400	500
10	25	1	50	100.0	25	400	500
11	50	10	25	500.0	25	400	500
12	25	10	50	1000.0	25	400	500
13	25	1 mg/ml	50	100000.0	25	400	500

(a) Los reactivos fueron añadidos en el orden indicado en esta tabla (1,2,3,4).

(b) Insulina estándar equivale a insulina no marcada ó insulina fría.

ellos se les tomó 20 ml de sangre que se colocaron en tubos de la misma manera que el grupo control.

5.5.4.2. Estudios de unión.

Se realizaron con la metodología descrita para radioanálisis de receptores (sección 5.5.3.5.).

5.5.4.3. Determinación de glucosa.

La determinación de glucosa sanguínea se realizó por la técnica de Hultman con ortotoluidina (52).

5.5.4.4. Determinación de insulina.

La determinación de insulina se realizó mediante radioinmunoanálisis, con hormona marcada de New England Nuclear (53) y anticuerpo desarrollado en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Pediatría del C.M.N., del I.M.S.S. (51).

5.5.4.5. Determinación de hemoglobina glucosilada.

La determinación de hemoglobina glucosilada se realizó por cromatografía de intercambio iónico (54).

5.5.5. Métodos estadísticos.

5.5.5.1. Cálculo del porcentaje de unión en radioanálisis de receptores.

El porcentaje de unión fué determinado después de que la radiactividad fué medida en el espectrofotómetro de centelleo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Unión} = \frac{\text{Radiactividad de la pastilla}}{\text{Radiactividad total}} \times 100$$

El porcentaje de unión específica se determinó por sustracción de el porcentaje de unión de ^{125}I -Insulina a 1×10^5 ng/ml de insulina no marcada (unión no específica), de el porcentaje total de insulina en cada punto (23).

5.5.5.2. Cálculo de coeficientes de variación intra e interensayo del método de radioanálisis de receptores.

Variación Intraensayo

Se efectuaron 10 ensayos con eritrocitos de una misma persona por duplicado en un solo día para cada una de las concentraciones de la curva de desplazamiento y a los datos de porcentaje de unión obtenidos se les determinó la media aritmética (\bar{X}) y la desviación estándar

(D.S.), con ambos valores obtuvimos el coeficiente de variación mediante la siguiente fórmula:

$$C.V. = \frac{D.S.}{\bar{X}} \times 100$$

Variación Interensayo

Para cada una de las concentraciones de insulina no marcada en la curva de desplazamientos se efectuaron determinaciones por triplicado, con eritrocitos de una misma persona día a día hasta completar 10 ensayos, a los datos de porcentaje de unión obtenidos se les determinó media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

Se calculó la concentración de insulina no marcada que se requiere para desplazar el 50% de ^{125}I -Insulina unida a los receptores (ID50) en cada ensayo. A los da de concentración de hormona no marcada, se les determinó media aritmética, desviación estándar y coeficientes de variación. (55).

5.5.5.3. Estudios de sensibilidad del método.

La sensibilidad del ensayo se define como la concentración más pequeña en que una sustancia puede ser

distinguida del cero (56). Esta es determinada por el 95% de límites de confianza (2 desviaciones estándar).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\bar{X}_{Bo} - 2 \text{ D.S.}}{\bar{X}_{Bo}} \times 100$$

donde B_o es la unión máxima, \bar{X}_{Bo} promedio de la unión máxima y D.S. la desviación estándar. El porcentaje de unión obtenido se extrapola en la gráfica logarítmica de la curva de desplazamiento normalizada y ésta concentración nos da la sensibilidad del método.

La zona sensible de la curva también puede determinarse en las gráficas semilogarítmicas de concentración de hormona no marcada contra porcentaje de unión de ^{125}I -Insulina unida a el receptor (Curva de desplazamiento). La parte recta de la curva corresponde a la zona sensible del método.

5.5.5.4. Cálculo del número de receptores.

Con el análisis de Scatchard (13), se obtiene la intersección con el eje de las abscisas que corresponde a la capacidad máxima de unión (R_o). En nuestro caso la capacidad máxima de unión nos indica la insulina total que unen 2.0×10^9 eritrocitos. Entonces:

$$B/\text{eritrocito} = \frac{R_o}{2 \times 10^9 \text{ eritrocitos}}$$

donde B/eritrocito es la insulina que une un eritrocito.

Para obtener el número de receptores se multiplicó la insulina unida/eritrocito, expresada en moles por el número de Avogadro.

$$\text{Receptores/eritrocito} = (B/\text{eritrocito}) (\text{No. Avogadro})$$

este cálculo se hizo para cada uno de los pacientes.

5.5.5.5. Cálculo de afinidad y ocupación.

Las constantes de afinidad se calcularon por la fórmula:

$$K_{\text{afinidad}} = \frac{B/F}{R_o - B}$$

donde B es la insulina unida, F la insulina libre y R_o la capacidad máxima de unión [11]. La constante de afinidad se calculo para cada una de las concentraciones de insulina de 0.1 a 100 ng/ml y para cada paciente. Los promedios de afinidad se graficaron contra porcentaje de ocupa-

ción del receptor.

$$\% \text{ Ocupación} = \frac{B}{R_o}$$

5.5.5.6. Análisis discriminante.

El análisis discriminante (57) establece cuales son las variables que determinan las diferencias entre los grupos y describe cuales son los valores que toman éstas, en cada uno de los grupos. Los objetivos de un estudio de discriminación pueden ser diferentes y es en función de esto que vamos a describir dos caminos a seguir:

1. Fase descriptiva. Se tienen "n" individuos que pertenecen a "g" poblaciones distintas, se quiere establecer el poder discriminatorio de una serie de variables: X_1, X_2, \dots, X_p , tomadas de ellos, es decir, se quiere saber la certeza con que esas variables se pueden emplear para establecer diferencias entre las poblaciones y por consiguiente determinan su eficacia para identificar a cual de las poblaciones pertenece un nuevo individuo.

En un principio se desea probar si las variables toman valores significativamente distintos en cada uno de los grupos ó poblaciones una vez probado el valor discriminativo de todas las variables en conjunto; inte-

resa por otro lado, el poder discriminativo de cada una de las variables para escoger un subconjunto de ese conjunto que permita la mejor diferenciación entre los grupos. Así se excluyen variables con bajo poder discriminatorio y se facilita la interpretación de resultados.

2. Fase de identificación. En esta fase el problema consiste en elaborar una regla de asignación, que nos permita predecir a que población pertenecen individuos cuya población de origen es desconocida.

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización del radioanálisis de receptores

6.1.1. Concentración de células.

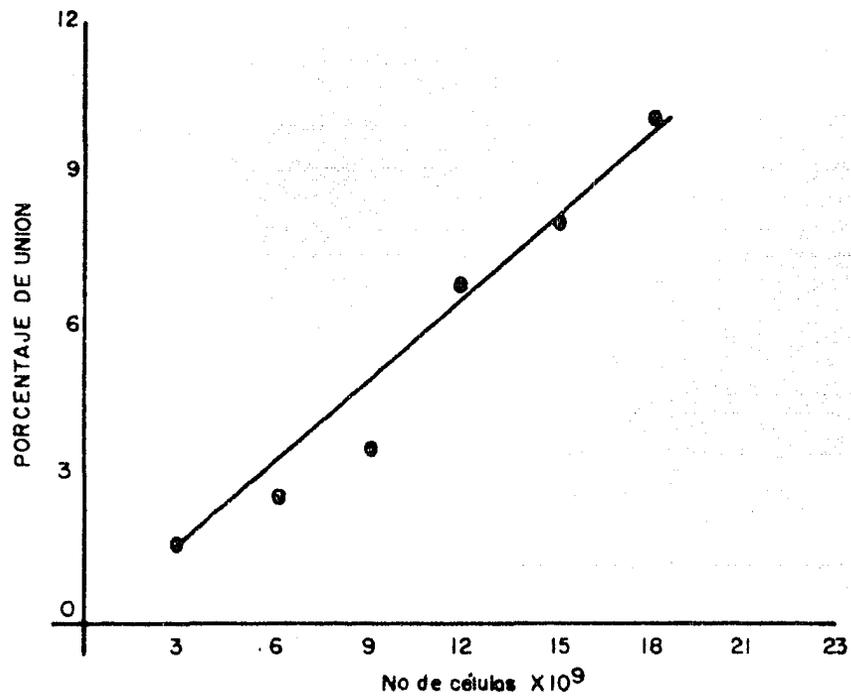
En cinco experimentos, donde se incubaron cantidades variables de eritrocitos ($3-18 \times 10^9$ eritrocitos) con 100 pg de ^{125}I -Insulina se obtuvieron los siguientes porcentajes de unión específica (Tabla No. 3).

Tabla No. 3. Unión de ^{125}I -Insulina a diferentes concentraciones de células.

No. eritrocitos ($\times 10^9$)	Unión específica (%)
3	1.64
6	2.58
9	4.11
12	6.71
15	8.18
18	10.09

Estos datos se observan en la gráfica No. 2. El número de células que se eligió para trabajar fué de 15×10^9 ya que el porcentaje de unión era adecuado para nuestros fines.

Gráfica No. 2. Efecto del número de células



6.1.2. Efecto de la temperatura y del tiempo de incubación

A una temperatura de 15°C se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla No. 4).

Tabla No. 4. Temperatura de incubación 15°C.

Tiempo (hr)	Unión específica (%)
1	3,93
2	8,28
3	9,06
4	10,87
5	15,91
24	18,50

Con estos resultados (Gráfica No. 3) se observó que el porcentaje de unión aumentó hasta las dos horas y alcanza cierto equilibrio entre las dos y tres horas de incubación, después de este tiempo el porcentaje de unión sigue aumentando sin llegar a alcanzar el equilibrio de la reacción al final de 24 horas.

A temperatura ambiente, los resultados obtenidos se encuentran en la tabla No. 5.

Al observar la gráfica correspondiente a estos

Gráfica No. 3. Efecto de la temperatura y tiempo de incubación.

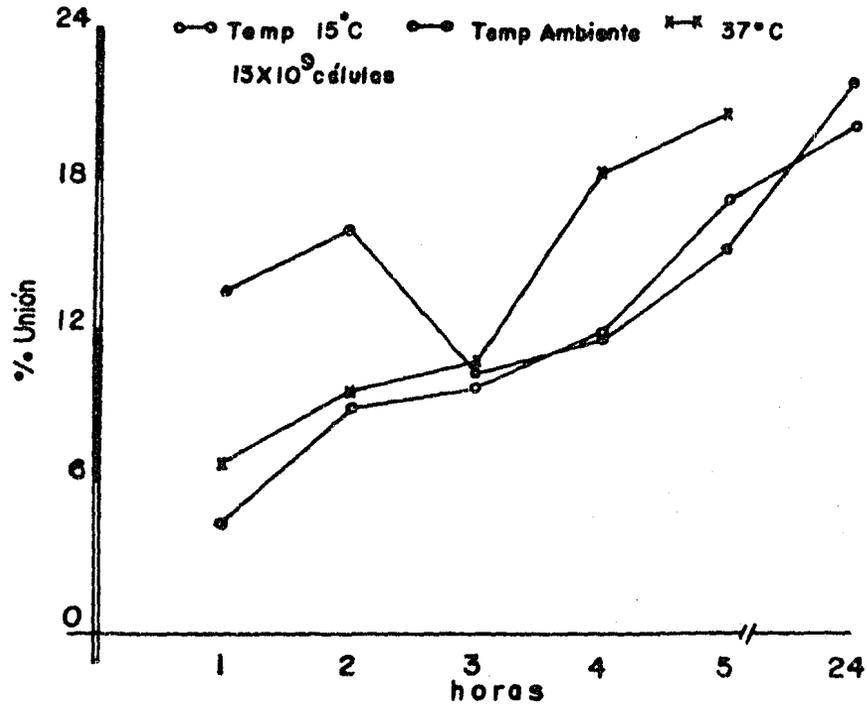


Tabla No. 5. Temperatura ambiente.

Tiempo (hr)	Unión específica (%)
1	12.16
2	14.34
3	9.48
4	10.96
5	13.98
24	20.02

resultados vemos que el porcentaje de unión aumentó lentamente hasta las 2 horas de incubación para disminuir bruscamente a las 3 horas y seguir aumentando hasta las 24 horas, sin llegar a observar un equilibrio de la reacción.

A una temperatura de incubación de 37°C , los resultados obtenidos aparecen en la Tabla No. 6. En la gráfica No. 3 se observó que el porcentaje de unión a 37°C aumento hasta las 3 horas de incubación y mantiene un equilibrio entre las 2 y 3 horas, la unión de ^{125}I -Insulina se elevó bruscamente después de las 4 horas de incubación. No se observó equilibrio de la reacción al final de las 5 horas de incubación.

Tabla No. 6. Temperatura
de incubación 37°C.

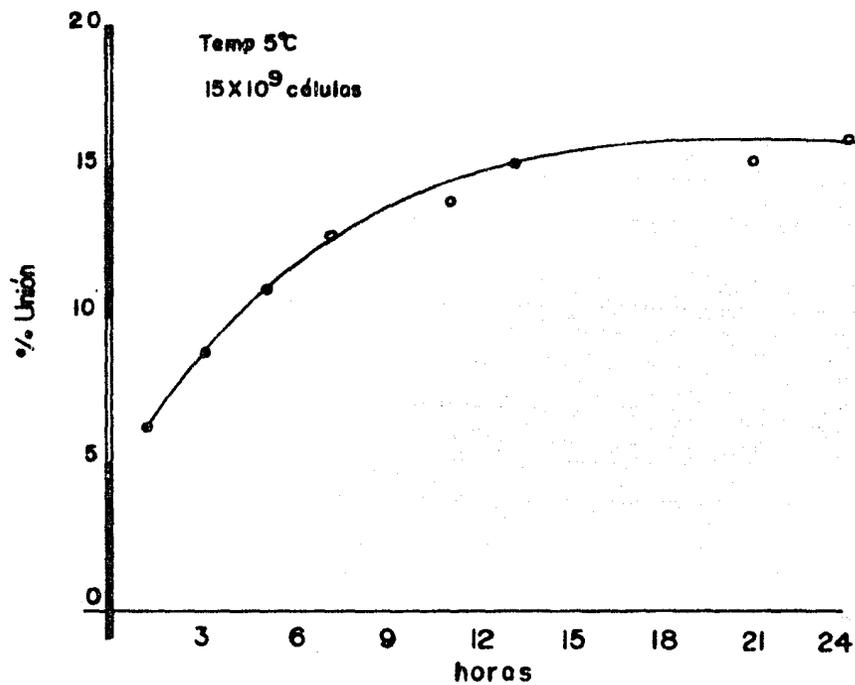
Tiempo (hr)	Unión específica (%)
1	6.19
2	7.49
3	9.85
4	16.74
5	19.00

Con una temperatura de incubación de 5°C, los resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla No. 7).

Tabla No. 7. Temperatura
de incubación 5°C

Tiempo (hr)	Unión específica (%)
1	6.35
3	9.87
5	11.01
7	12.91
9	13.46
11	14.00
13	15.76
23	15.06
24	16.39

Gráfica No. 4. Efecto de la temperatura.



En la gráfica No, 4 se muestra el comportamiento de la curva a 5°C y se observó que la unión es rápida y progresiva hasta las 9 horas y entre este tiempo y las 13 horas hay muy poco aumento en la unión, el equilibrio se alcanzó después de este tiempo.

La temperatura y tiempo de incubación que se eligió para trabajar fueron 5°C y 24 horas respectivamente, ya que en éstas condiciones se alcanzó el equilibrio de la reacción hormona-receptor.

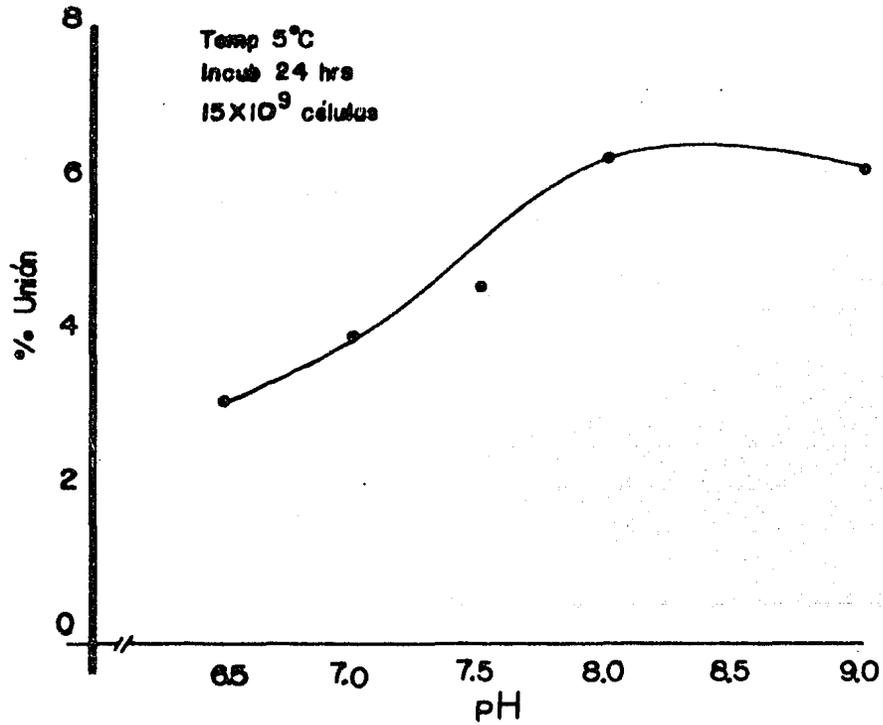
6.1.3. Efecto del pH.

Para determinar el pH óptimo de unión de ^{125}I -Insulina a eritrocitos humanos, se trabajó en intervalo de pH de 6.5-9.0. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla No. 8.

Tabla No. 8. Efecto del pH.

pH	Unión específica (%)
6.5	3.12
7.0	3.58
7.4	4.63
8.0	6.31
9.0	6.18

Gráfica No. 5. Efecto del pH.



Tanto en la tabla No. 8 como en la gráfica No. 5 se observó claramente que el pH que presentó un mayor porcentaje de unión de ^{125}I -Insulina fué 8.0, por ello se eligió como pH de trabajo.

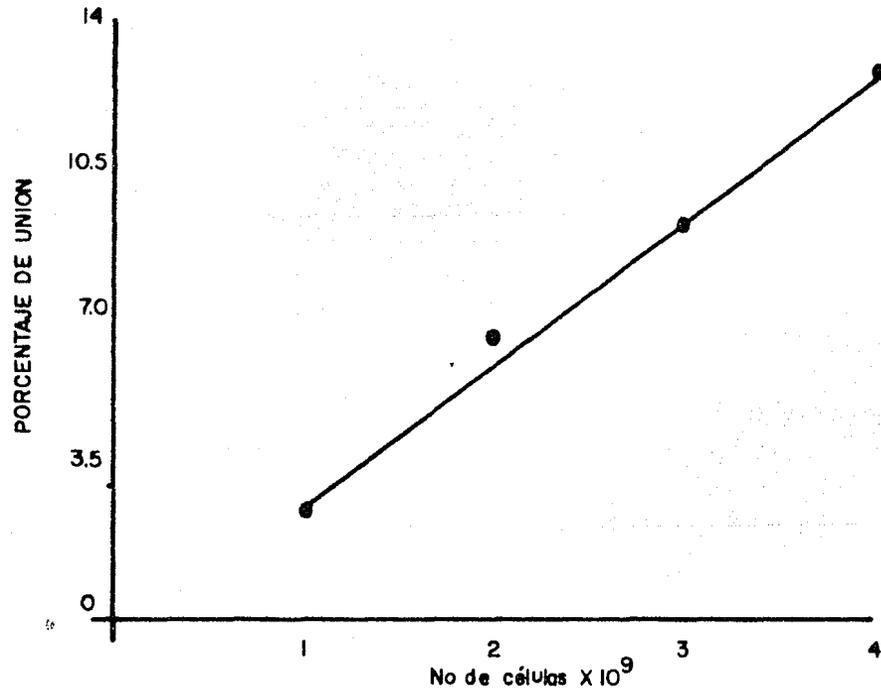
6.1.4. Ajuste de condiciones.

Se realizaron experimentos que reunieron las condiciones ideales de pH, tiempo y temperatura de incubación, con concentraciones de células menores a las que se utilizaron en el apartado 5.5.3.1. y un volúmen menor de incubación. Esto se realizó debido a que se trabajó con una población pediátrica el volúmen de muestra para realizar los estudios de unión tuvo que ser la menor posible. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 9.

Tabla No. 9. Ajuste del número de células.

No. células (x 10^9)	Unión específica (%)
1	2.64
2	6.57
3	9.32
4	12.69

Gráfica No. 6. Ajuste del número de células.



La gráfica que se obtuvo con estos resultados es la No. 6, donde se puede ver que el comportamiento de la curva es lineal. El número de eritrocitos que presentó un adecuado porcentaje de unión para nuestros fines fué 2×10^9 eritrocitos.

6.1.5. Radioanálisis de receptores.

En las condiciones ideales de número de células (2×10^9 eritrocitos), temperatura (5°C), tiempo de incubación (24 hrs.) y pH (8.0), se realizaron desplazamientos a concentraciones variables de hormona no marcada ($0-10^5$ ng/ml) y se llegó al procedimiento que se describe en la sección 5.5.3.5. Los resultados se presentan en la Gráfica No. 7.

La zona sensible de la curva fué de 0.5 a 50 ng/ml de insulina. La sensibilidad determinada matemáticamente fué de 0.75 ng/ml. El ID50 fué de 9.1 ng/ml en los interensayos y de 8.0 ng/ml para los intraensayos (Tabla No. 10).

Gráfica No. 7

RECEPTORES DE INSULINA.

DESPLAZAMIENTOS.

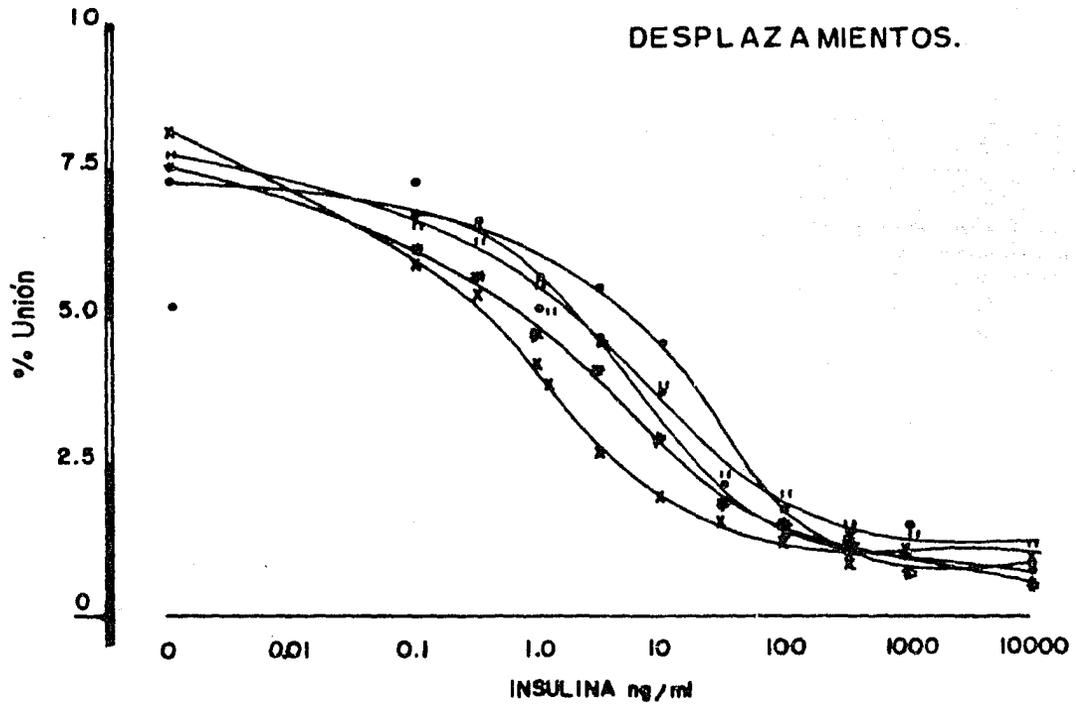


Tabla No. 10. Coeficientes de variación intra e interensayo del ID50.

	n	Insulina estándar (ng/ml).	D.S.	C.V. (%)
Intraensayos	10	8.0	1.24	15.5
Interensayos	10	9.1	1.22	13.4

En la tabla No. 11 y 12 se muestran los coeficientes de variación intra e interensayo para cada una de las concentraciones de la curva de desplazamiento.

6.2. Resultados de estudios en diabéticos insulino-dependiente.

6.2.1. Obtención de los eritrocitos.

Por la técnica de exclusión de azul de tripano se vió que más del 95 % de los eritrocitos fueron viables. El porcentaje de reticulocitos observados fué de 1%. Rara vez aparecieron leucocitos. Las determinaciones hematológicas de las suspensiones que se utilizaron en el radioanálisis de receptores aparecen en la tabla No. 13.

Tabla No. 11. Coeficientes de variación intraensayo.

Concentración de insulina estándar (ng/ml)	No. Ensayos (n)	% Unión	D.S.	C.V. (%)
0 (U.máx.)	10	4.78	0.87	19.53
0.1	10	3.78	0.55	14.67
0.5	10	3.17	0.40	12.52
1.0	10	2.84	0.55	19.46
2.0	10	2.15	0.38	18.02
5.0	10	1.77	0.27	15.70
10	10	1.49	0.26	17.43
50	10	0.92	0.14	15.70
100	10	0.40	0.11	27.50
500	10	0.36	0.12	33.00
100 000 (U.no específica)	10	2.81	0.45	15.98

Tabla No. 12. Coeficientes de variación interensayo.

Concentración de Insulina estándar (ng/ml).	No. Ensayos (n)	% Unión	D.S.	C.V. (%)
0 (U.máx.)	10	7.52	1.57	20.8
0.1	10	6.51	1.24	18.9
0.5	10	6.47	1.17	18.7
1.0	10	5.64	1.25	22.2
2.0	10	5.17	0.86	16.7
5.0	10	4.52	1.05	23.2
10	10	3.64	0.60	16.7
50	10	2.40	0.59	24.6
100	10	2.08	0.68	33.1
500	10	1.55	0.45	29.3
100 000 (U.no específica)	10	2.58	0.31	12.0

Tabla No. 13. Propiedades hematológicas de las suspensiones de eritrocitos.

Determinación	n	\bar{X} (+ 1 D.S.)
Hemoglobina (g/dl)	33	14.65 ± 0.90
Hematócrito (%)	33	43.78 ± 1.89
V C M (fl)	33	86.81 ± 3.46
H C M (pg)	33	30.00 ± 5.23

VCM = Volúmen medio de los hematíes individuales.

HCM = Contenido de hemoglobina por hematíe.

CCHM = Concentración media de hemoglobina por 100 ml.

6.2.2. Estudios de unión.

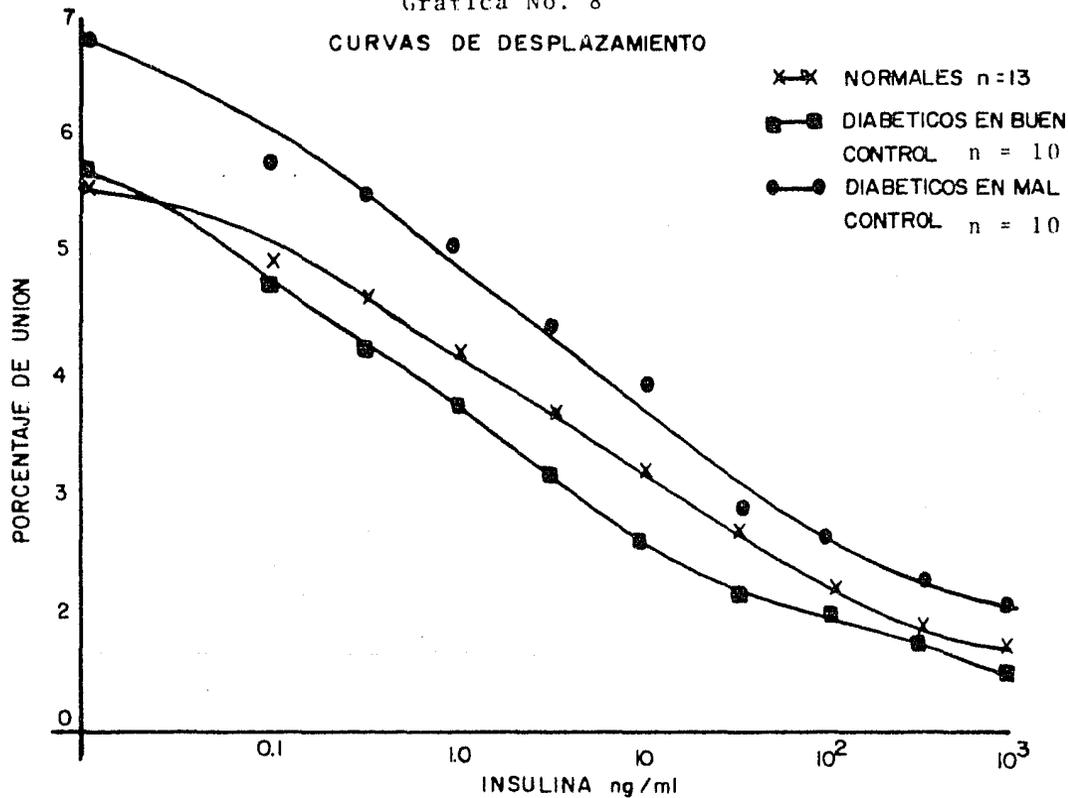
6.2.2.1. Curvas de desplazamientos.

Las curvas de desplazamientos para cada uno de los tres grupos (control y diabéticos insulino-dependiente en buen y mal control metabólico), se muestran en la gráfica No. 8.

6.2.2.2. Análisis de Scatchard.

El análisis de Scatchard para la unión de insulina a su receptor específico en los tres grupos aparecen

Gráfica No. 8
CURVAS DE DESPLAZAMIENTO



en la gráfica No. 9 , donde se señala como obtener la máxima capacidad de unión (R_0), que nos permite determinar el número de receptores por célula.

La gráfica No. 10 muestra la afinidad como función de la ocupación del receptor, para cada uno de los grupos.

Tabla No. 14 (+ 1 D.S.)

Determinación	Normales	IDDM (Buen control)	IDDM (Mal control)
Unión específica máxima (%)	5.57 \pm 1.65	5.73 \pm 1.50	6.82 \pm 1.70
ID50 (ng/ml)	6.62 \pm 2.50	6.95 \pm 2.77	5.97 \pm 2.56
ke ($10^8 M^{-1}$)	4.51 \pm 2.25	5.78 \pm 2.51	5.23 \pm 2.61
kf ($10^8 M^{-1}$)	2.30 \pm 1.20	3.05 \pm 1.70	2.60 \pm 1.39
Receptores (No.)	365 \pm 155	310 \pm 119	400 \pm 135

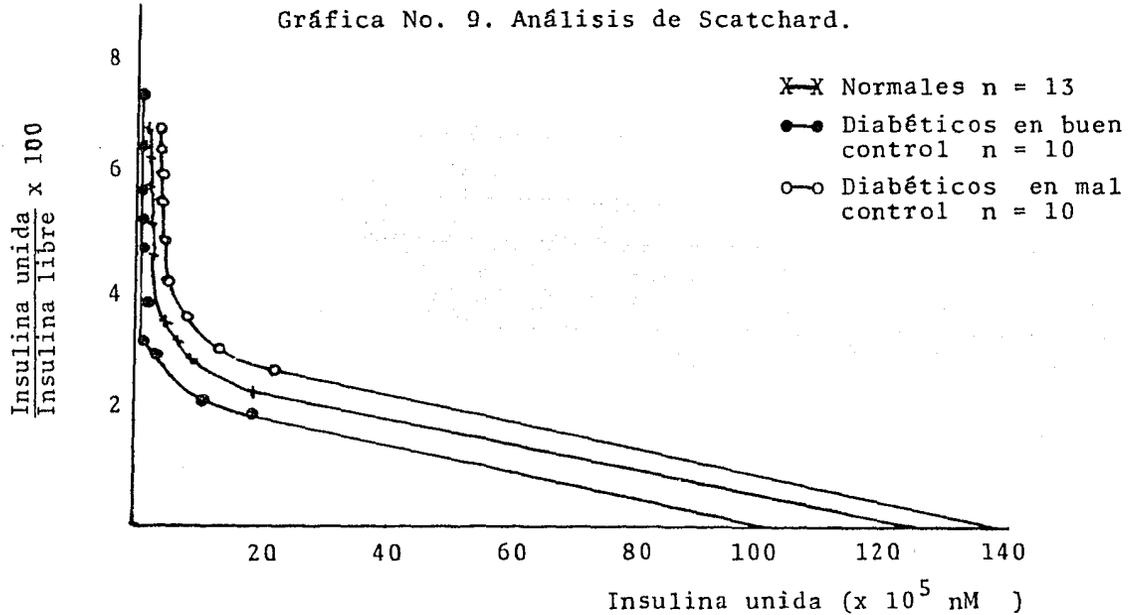
ke = constante de afinidad cuando los receptores están vacíos.

kf = constante de afinidad cuando los receptores están llenos.

6.2.3. Hemoglobina glucosilada, glucosa e insulina.

En la tabla No. 15 se muestran los resultados obtenidos por grupo en las determinaciones de hemoglobina glucosilada, glucosa e insulina.

Gráfica No. 9. Análisis de Scatchard.



La intersección con el eje de las abcisas es la capacidad máxima de unión (R_0). El grupo control, el grupo de diabéticos en buen control y mal control metabólico, tuvieron valores de R_0 , de 121 ± 51.43 , 102.9 ± 39.44 y $139.9 \pm 44.92 \times 10^{-5}$ nM respectivamente.

Gráfica No. 10

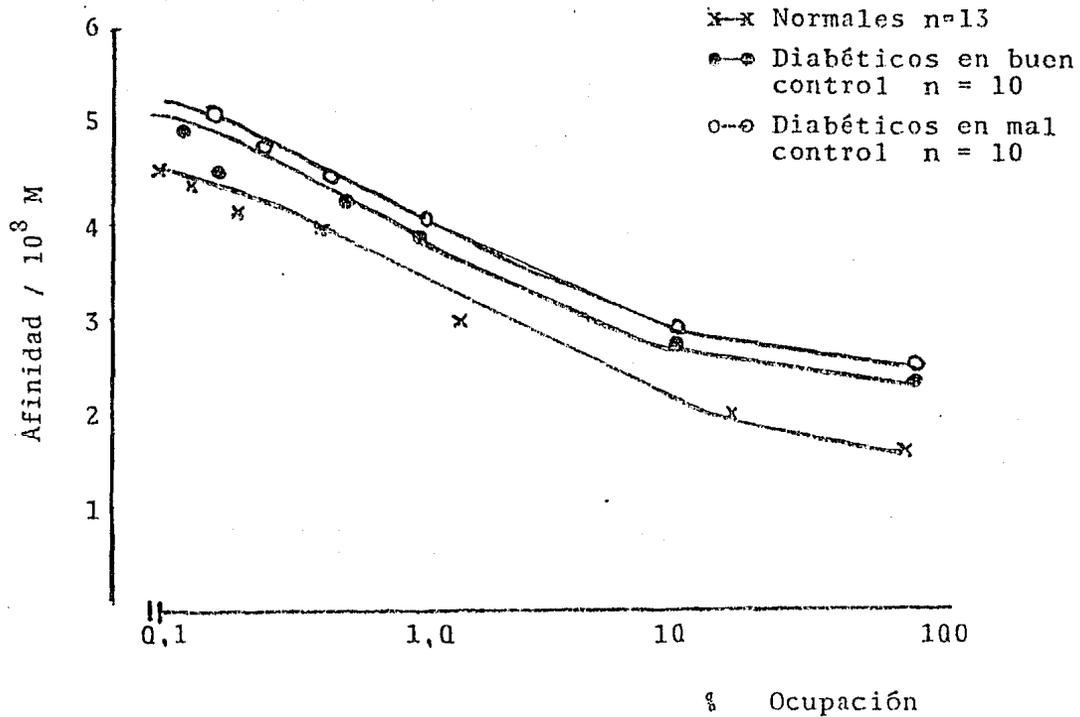


Tabla No. 15 (+ 1 D.S.) .

Determinación	Normales	IDDM (buen control)	IDDM (mal control)
Hemoglobina glucosilada (%)	7.72 \pm 0.81	10.95 \pm 0.61	15.93 \pm 2.07
Glucosa (mg/dl)	81.60 \pm 8.25	226.26 \pm 93.97	365.34 \pm 72.22
Insulina (μ U/ml)	6.26 \pm 5.72	1.30 \pm 4.11	2.20 \pm 3.84

6.2.4. Resultados de correlación.

No hubo correlación significativa entre la unión específica máxima y la concentración de insulina plasmática ($r = -0.06$). Tampoco se encontró correlación entre la unión específica máxima con el número de receptores ($r = 0.26$) y la afinidad ($r = 0.33$). El número de receptores correlacionó negativamente con la afinidad ($r = -0.64$). No se encontró correlación entre el número de receptores y la concentración de insulina plasmática ($r = -0.28$).

Las diferencias significativas entre grupos, se calcularon por la λ de Wilks' y se obtuvieron los siguientes resultados:

Hemoglobina glucosilada (%)	$p < 0.05$
Insulina ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	$p < 0.05$
ID50 (ng/ml)	$p < 0.05$
Glucosa (mg/dl)	$p < 0.05$
Receptores (No.)	$p < 0.05$

6.2.5. Análisis discriminante.

Para seleccionar las variables que determinan las diferencias entre los tres grupos en las determinaciones de hemoglobina glucosilada, insulina, glucosa, radioanálisis de receptores (porcentaje de unión máxima, ID50,

ke, kf y No. de receptores), se llevó a cabo un análisis discriminante por pasos, para la selección de las variables se utilizó el criterio de Wilks (57).

El procedimiento para la selección de variables, se determinó después de incluir:

- X1, Hemoglobina glucosilada
- X2, Insulina
- X3, Constante de afinidad cuando el receptor está vacío (ke).
- X4, Constante de afinidad cuando el receptor está lleno (kf).
- X5, Porcentaje de unión específica máxima
- X6, ID50
- X7, Dosis de insulina que recibe el paciente
- X8, Duración del padecimiento
- X9 Glucosa
- X10, Número de receptores.

Del análisis discriminante se obtuvo una función discriminante mediante la cual vamos a conocer la influencia que tiene cada variable en la diferenciación entre grupos (Tabla No. 16).

De acuerdo a los coeficientes asociados a las variables se observó que las variables que más contribuyen a diferenciar entre grupos son: hemoglobina glucosilada, insulina, ID50, glucosa y número de receptores cu-

Los coeficientes son: -0.80719, 0.26919, -0.31080, -0.52302 y 0.12658, respectivamente. Al multiplicar éstos coeficientes por los valores de cada variable asociada ob tuvimos una función que es una combinación lineal de las cinco características mencionadas anteriormente.

Tabla No. 16

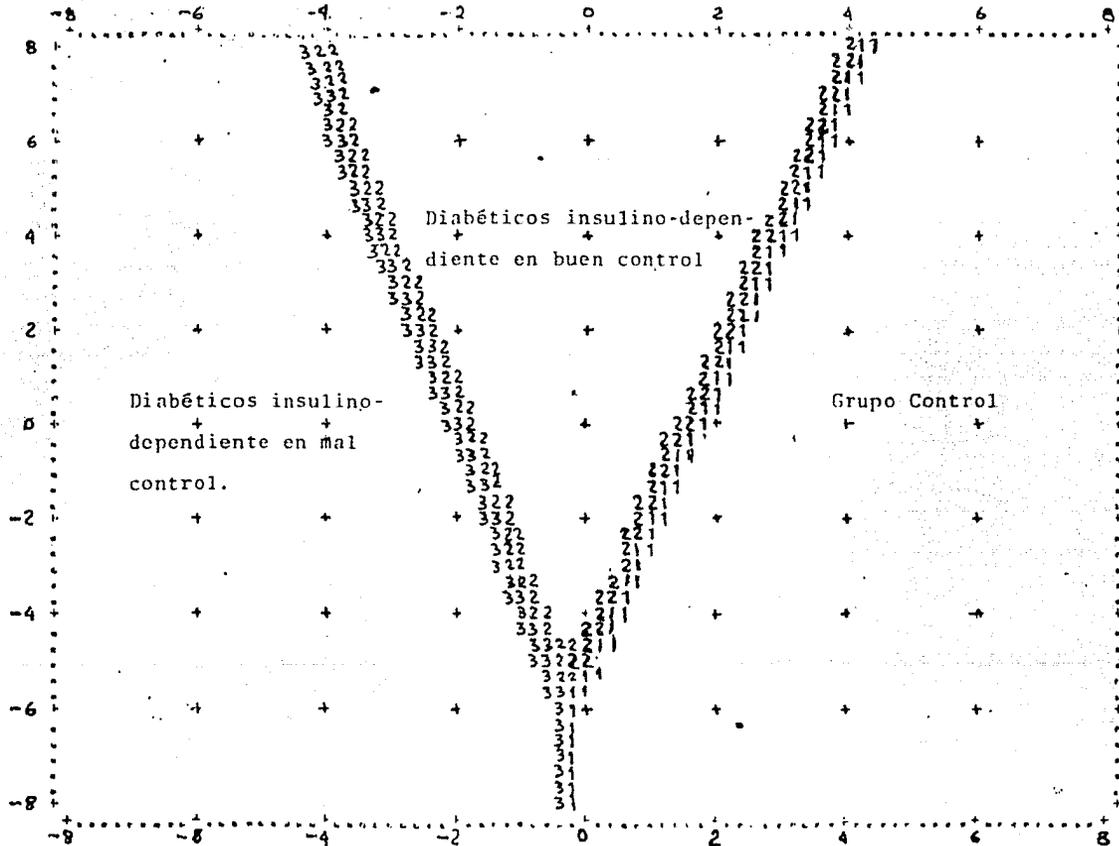
Variab <u>l</u> es	Función
X1 Hemoglobina glucosilada	-0.80719
X2 Insulina	0.26919
X6 ID50	-0.31080
X9 Glucosa	-0.52302
X10 Número de receptores	0.12658

La combinación lineal de las cinco variables mencionadas anteriormente es:

$$D = -0.80719X_1 + 0.26019X_2 - 0.31080X_6 - 0.52302X_9 + 0.12658X_{10}$$

El objeto de tal función es que exista una máxima separación entre los grupos. En el mapa territorial (Gráfica No. 11), vemos que el grupo de pacientes con IDDM en mal control metabólico (Grupo No. 3), tiene va-

Gráfica No. 11. MAPA TERRITORIAL DISCRIMINANTE



lores de $D < 0$, el grupo de diabéticos insulino-dependiente en buen control metabólico (Grupo No. 2), tiene valores de $D \equiv 0$ y el grupo control (Grupo No. 1) valores de $D > 0$.

En resumen, los tres grupos son distintos y las diferencias están dadas por las variables que presentan coeficientes más altos.

Para dar validez a nuestra función discriminante el programa calculo los valores de D para cada uno de los individuos de nuestro estudio y de acuerdo con el mapa territorial discriminante los asignó a cada grupo y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla No. 17

Grupo	No. de casos.	1	2	3
1. Control	13	13 100%	0 0%	0 0%
2. IDDM (Buen control)	10	0 0%	10 100%	0 0%
3. IDDM (Mal control)	10	0 0%	1 10%	9 90%

El porcentaje de casos agrupados correctamente fué de 96.97%.

7. DISCUSION DE RESULTADOS

Para evaluar la cinética de la interacción insulina-receptor en eritrocitos de pacientes con IDDM, se implementó el radioanálisis de receptores. Para ello se analizó el comportamiento del receptor de insulina mediante las variables que de antemano sabíamos que afectan a receptores de membrana (2,6) y establecer así nuestras condiciones de trabajo. Se observó que a diferentes concentraciones de células (Gráfica No. 2), el porcentaje de unión aumentó linealmente, lo cual indica que el porcentaje de unión de ^{125}I -Insulina es directamente proporcional a la concentración de eritrocitos.

A 15°C , temperatura ambiente y 37°C (Gráfica No. 3), el comportamiento de las curvas fué irregular por lo que se decidió probar a 5°C (Gráfica No. 4) con lo que se observó que el porcentaje de unión de ^{125}I -Insulina aumentó lentamente hasta que la interacción hormona-receptor alcanzó un equilibrio, efecto que se observó por el aplanamiento de la curva, por ello se decidió que 5°C fuera la temperatura de trabajo. El tiempo de incubación pudo haber sido cualquiera después de las 15 hrs. de incubación ya que en éste tiempo se alcanzó el equilibrio de la reacción, por facilidad de trabajo se escogió el de 24 hrs.

El pH del medio influye en la interacción hormoo

na-receptor y esto lo observamos en la gráfica No. 5 donde se aprecia que el porcentaje de unión de ^{125}I -Insulina, varía con el pH. Se eligió como pH de trabajo el de 8 ya que a éste valor se tuvo un mayor porcentaje de unión.

Por el tipo de pacientes que se manejaron (edad pediátrica), se disminuyó el número de eritrocitos y el volumen final de incubación, a pH 8.0 y temperatura de incubación 5°C y tiempo de incubación de 24 hrs. sin que ello alterara la unión que se encontró con un número mayor de células. Los resultados se muestran en la gráfica No. 6, donde se observa que el comportamiento cuando se trabaja con un número menor de células, es similar a el de la gráfica No. 2, donde se trabajó con un número de células mayor. Con esto se puede ver que aún a bajas concentraciones de células el porcentaje de unión de ^{125}I -Insulina es directamente proporcional al número de eritrocitos. El número de células que se eligió para trabajar fué de 2.0×10^9 , con un porcentaje de unión adecuado a la finalidad del estudio.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo se realizaron estudios de desplazamientos hasta que las curvas, mostraron que puntos eran necesarios (concentración de insulina estándar ó insulina fría ó insulina no marcada), para nuestra metodología y se estableció el protocolo que aparece en la tabla No. 2. Las curvas que se

obtuvieron se encuentran en la gráfica No. 7, y muestran las curvas clásicas de competencia ó desplazamiento.

La sensibilidad del método fué de 0,75 ng/ml y el área sensible en las gráficas de desplazamientos en papel semilogarítmico fué de 0.5 a 50 ng/ml.

Se calculó el coeficiente de variación intra e interensayo del ID50, que es la concentración de insulina estándar que desplaza el 50% de ^{125}I -Insulina e indica como varía nuestro método en la zona sensible, esto puede ser afectado por un cambio de anticuerpo. Cuando se tiene un mismo anticuerpo los coeficientes de variación intra e interensayo, no deben variar mucho por lo que constituye un parámetro de control de calidad (Tabla No. 10).

Los coeficientes de variación intra e interensayo son altos pero aceptables (Tabla No. 10-12), si pensamos lo siguiente, en radioinmunoanálisis (RIA), se obtienen coeficientes de variación hasta de 16.8 para angiotensina (58) y 16.5 para α -hidroxiprogesterona (59) y aún cuando el radioanálisis de receptores trabaja bajo el mismo principio que el RIA, en el primero se trabaja con células y en el segundo con anticuerpos altamente purificados lo que hace que sea más preciso. Los coeficientes de variación más elevados se tienen cuando hay una alta concentración de la hormona. No obstante, es recomendable cuando se desee evaluar el receptor de insulina en pacient

tes, que se compare contra un sujeto normal para tener así un mejor control.

Las curvas de desplazamientos (Gráfica No. 8), del grupo control, grupo de diabéticos insulino-dependiente en buen y mal control metabólico, muestran que el porcentaje de unión de ^{125}I -Insulina del grupo de pacientes con IDDM en mal control metabólico es mayor que el normal y éste a su vez mayor que el grupo de diabéticos insulino-dependiente en buen control. Sin embargo éstas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El análisis de Scatchard (Gráfica No. 9), muestra la máxima capacidad de unión para cada grupo, útil para calcular el número de receptores, constantes de afinidad y porcentaje de ocupación. Además en esta gráfica vemos lo que De Meyts llama cooperatividad negativa (11,12), que es un cambio de afinidad del receptor que de una alta afinidad pasa a una baja afinidad y que algunos autores atribuyen a la existencia de dos poblaciones diferentes de receptores, una con alta afinidad y la otra con baja afinidad, ó bien, según otros autores a una combinación de ambos modelos.

En la gráfica No. 10, se observa como disminuye la afinidad de los receptores, conforme aumenta la ocupación de éstos, de forma tal que el grupo de diabéticos en

mal control metabólico tiene mayor afinidad que el grupo de diabéticos en buen control y estos grupos a su vez tienen mayor afinidad que el grupo control. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

A diferencia de lo reportado por otros autores (43,44) no se encontró correlación entre la concentración de insulina y el porcentaje de unión lo que concuerda con los hallazgos de Fantus (35). Tampoco hubo correlación entre la insulina y el número de receptores, lo cual contradice lo reportado por diversos autores (29,43) y concuerda con los resultados de Pedersen (45) y Fantus (35). Con base a éstos resultados podemos especular que la insulina no regula ni el número de receptores, ni la afinidad del receptor, ya que no hubo correlación entre la insulina y la afinidad.

Por otra parte, no se encontró correlación entre la unión máxima específica y el grado de control metabólico (hemoglobina glucosilada). Pero si hubo diferencias significativas en cuanto al número de receptores ($p < 0.05$) cuando se analizó por grupos de forma tal que para el grupo control el número de receptores fué de 365 ± 155 , para el grupo de diabéticos insulino-dependiente en buen control metabólico fué de 310 ± 119 y para el grupo en mal control de 400 ± 135 . Así el número de receptores parece depender del grado de control metabólico del paciente.

Las variables que diferencian nuestros tres grupos son la hemoglobina glucosilada, insulina, ID50, glucosa y número de receptores, de acuerdo a el análisis discriminante. Esto indica que de los estudios de unión, el ID50 y el número de receptores son útiles para clasificar a un nuevo paciente diabético dentro de un grupo, ya sea en el de buen ó mal control metabólico, sin embargo, los parámetros de elección siguen siendo la hemoglobina glucosilada y/ó la glucosa sanguínea.

En el mapa discriminante (Gráfica No. 11) observamos que el valor de D en los pacientes en buen control metabólico (Grupo No. 2) es más cercano al valor de D del grupo control (Grupo No. 1) y que el valor de D para el grupo de pacientes con IDDM en mal control (Grupo No. 3) se aleja del valor de D del grupo normal.

8. CONCLUSIONES

- 8.1. Aún cuando el eritrocito no es célula blanco de la insulina posee receptores específicos para esta hormona.
- 8.2. La unión de insulina a eritrocitos humanos (receptores) depende de la concentración de eritrocitos, temperatura, tiempo de incubación y pH.
- 8.3. En base a los coeficientes de variación podemos afirmar que el método de radioanálisis de receptores de insulina es confiable y reproducible.
- 8.4. La sensibilidad del método es de 0.75 ng/ml y la zona sensible de la curva es de 0.5 - 50 ng/ml.
- 8.5. En el grupo de pacientes con IDDM hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), en el número de receptores, dependiendo del grado de control metabólico.
- 8.6. Las variables que diferencian entre los tres grupos son la hemoglobina glucosilada, la insulina, el ID50, la glucosa y el número de receptores.
- 8.7. No se encontró correlación entre niveles de insulina y glucosa en sangre con el número de receptores. De acuerdo a ello se concluye que ni la insulina, ni la

glucosa regulan el número de receptores de insulina en el eritrocito humano,

- 8.8. El número de receptores promedio por eritrocito encontrado en nuestros tres grupos fué de 358 ± 139 .
- 8.9. La aplicación clínica del método de radioanálisis de receptores de insulina, apoyada por el análisis discriminante indica que junto con la hemoglobina glucosilada, puede ser un parámetro útil para valorar el grado de control metabólico en pacientes diabéticos insulino-dependiente.
- 8.10. La determinación de hemoglobina glucosilada es el mejor parámetro de control metabólico del paciente con IDDM.
- 8.11. De acuerdo a la ecuación y mapa territorial discriminantes, el valor de D para el grupo de diabéticos insulino-dependiente en buen control metabólico está más próximo al valor de D del grupo control, que el valor de D para el grupo de diabéticos insulino-dependiente en mal control metabólico. Con lo que se concluye que el grupo de pacientes con IDDM en buen control tiene valores de hemoglobina glucosilada, glucosa, insulina, ID50 y número de receptores más

cercanos al grupo control que el grupo de pacientes diabéticos insulino-dependiente en mal control metabólico.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Stryer, L. "Bioquímica". Ed. Reverte. Venezuela. 1976. pags. 806-825.
2. Kahn, C.R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. J.Cell.Biol. 70: 261-286 (1976).
3. Cohen, J.B., Changeux, J.P. The cholinergic receptor protein in its membrane environment. Ann. Rev. Pharmacol. 15 : 83-103 (1975).
4. Chan, L., O'Malley, W.B. Steroid hormone action; Recent Advances. Ann. Int. Med. 89 (Part 1) : 694-701 (1978).
5. Oppenheimer, J.H., Dillmann, W.H., Schwartz, H.L., Towle, H.C. Nuclear receptors and thyroid hormone actions: a progress report, Fed. Proc. 38: 2154-2161 (1979).
6. Kahn, C.R., Roth, J. Cell membrane receptors for polypeptide hormones. Application to the study of disease states in mice and men. Am. J. Clin. Pathol. 63: 656-667 (1975).
7. Cuatrecasas, P. Interaction of insulin with the cell membrane. The primary action of insulin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63: 450-457 (1969).
8. Bari, G. Polypeptide hormones. What are they doing in cells. Science, 201: 895-897 (1978).

9. Cuatrecasas, P. Membrane receptor, *Ann. Rev. Biochem.* 43: 169-214 (1974).
10. Kahn, R. Receptors for peptide hormones. New insights into to pathophysiology of disease states in man. *Ann. Int. Med.* 86: 205-219 (1977).
11. De Meyts, P., Roth, J., Neville, M.D., Gavin, R.J., Lesniack, A.M. Insulin interactions with its receptors: Experimental evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 154-161 (1973).
12. De Meyts, P., Bianco, A., Roth, J. Site-site interactions among insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 251: 1877-1888 (1976).
13. Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660-672 (1949).
14. Cuatrecasas, P. Insulin receptor interactions in adipocyte tissue cells. Direct measurement and properties *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68: 1264-1268 (1971).
15. Cuatrecasas, P., Desbusquois, B., Krug, T. Insulin-receptor interactions in liver cell membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 333-339 (1971).
16. Freychet, P., Kahn, R., Roth, J., Neville, D.M. Insulin interaction with liver plasma membranes. Independence of binding of the hormone and its degradation. *J. Biol. Chem.* 247: 3953-3961 (1972).

17. Cuatrecasas, P. Isolation of the insulin receptor of the insulin receptor of liver and fat cell membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69: 318-322 (1972).
18. Beck, N.H., Pedersen, D., Kragballe, K., Schwartz, S.N. The monocyte as a model for the study of insulin receptors in man. Diabetologia. 13: 563-569 (1977).
19. Shimizu, F., Kahn, R. Insulin radioreceptor assay on murine splenic leucocytes and peripheral erythrocytes. Endocrinology. 110: 474-480 (1982).
20. Ginsberg, H.B., Kahn, R.C., Roth, J. The insulin receptor of the turkey erythrocytes: similarity to mammalian insulin receptors. Endocrinology. 100: 82-90 (1977).
21. Kappy, S.M., Plonick, P.L., Milley, R.J., Rosengerg, A., Molteni, A.R., Jones, D.M., Simmons, A.M. Ontogeny of erythrocyte insulin binding in the shepp. Endocrinology. 109: 611-617 (1981).
22. Nakao, K., Kagawa, S., Murakoso, K., Hata, M., Matsuo, A. Radioreceptor assay of insulin using rabbit erythrocyte membrane. Chem Pharm. Bull. 28: 305-310 (1980).
23. Gambhir, K.K., Archer, J.A., Bradley, C.J. Characteristics of human erythrocyte insulin receptor. Diabetes. 27: 701-708 (1978).
24. Kahn, R.C.; et. al. Insulin receptors, receptor antibodies and the mechanism of insulin action. Recent.

- Progress in Hormone Research. 37: 477-513 (1981),
25. Im, J.H., Meezan, E., Rackley, C.E., Kim, D.H. Isolation and characterizations of human erythrocyte insulin receptors. J. Biol. Chem. 258: 5021-5026 (1983).
 26. Czech, M.P., Masague, J., Subunit structure and dynamics of the insulin receptor. Fed. Proc. 41: 2719-2723 (1982).
 27. Lehninger, A. "Bioquímica". 2a ed, Ediciones Omega. Barcelona, España. 1979, pags. 828-832.
 28. Herzberg, V. Evidence for two insulin receptor populations on human erythrocytes. Nature. 286: 279-281 (1980).
 29. Gavin, J. P., Roth, J., Neville, D.M., De Meyts, P., Buell, D.N. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations. A direct demonstration in cell culture. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71: 84-88 (1974).
 30. Blackard, W.G., Guzelian, P.S., Small, M.E. Down regulation of insulin receptors in primary cultures of rat hepatocytes in monolayer. Endocrinology. 103: 548-553 (1979).
 31. Bar, R.S., Harrison, L.C., Muggeo, M., Gorden, P., Kahn, C.R., Roth, J. Regulation of insulin receptor in normal and abnormal physiology in humans. Adv. Intern. Med. 24: 23-54 (1979).

32. Bar, R.S. Factors that control insulin action at the receptor. *Am. J. Med.* 74 (1A): 18-30 (1983).
33. Muggeo, M., Bar, R.S., Roth, J., Kahn, C.R., Gorden, P. The insulin resistance of acromegaly: evidence for two alterations in the insulin receptor on circulating monocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 17-25 (1979).
34. Bar, R.S., Gorden, P., Roth, J., Siebert, C.W. Insulin receptors in patients with insulinomas: changes in receptor affinity and concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44: 1210-1213 (1977).
35. Fantus, I.G., Byan, J., Gorden, P. The insulin receptor in insulin dependent diabetes mellitus; an in vivo and in vitro study. *Metabolism.* 30: 510-517 (1981).
36. Olesfky, J.M., Reaven, G. Insulin binding in diabetes. Relations with plasma insulin levels and insulin sensitivity. *Diabetes.* 26: 680-688 (1977).
37. Felig, P., Soman, V. Insulin receptors in diabetes and others conditions. *Am. J. Med.* 67: 913-915 (1979).
38. Olefsky, J.M. Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese patients. *J. Clin. Invest.* 57: 1165-1172 (1976).
39. Bar, R.S., Muggeo, M., Kahn, C.R., Gorden, P., Roth, J. Characterization of insulin receptors in patients with the syndromes of insulin resistance and acantho-

- sis nigricans, *Diabetologia*. 18: 109-116 (1980).
40. Marble, A., White, P., Bradley, R.F., Krall, P.L. "Diabetes mellitus". 11a. ed. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia, USA. 1975. pags. 1-3.
41. Krupp, M.A., Chaton, M.J. Current Medical Diagnosis & Treatment. Ed. Lange Medical Publications, Los Altos California. U.S.A. 1981. pags. 735-754.
42. Hepp, K.D., Langley, J., Von Funck, H.J., Renner, R., Kemmler, W., Increased insulin binding capacity of liver membranes from diabetic chinese hamsters, *Nature*. 258: 154 (1975).
43. Bar, R.S., Roth, J. Insulin receptor status in disease states of man. *Arch. Intern. Med.* 137: 474-481 (1977).
44. Henry, L.C., Ginsberg, N. Investigation of insulin sensitivity in treated subjects with ketosis-prone diabetes mellitus. *Diabetes*. 26: 278-283 (1977).
45. Pedersen, O., Beck-Nielsen, H., Heding, L. Insulin receptors and monocytes from patients with ketosis-prone diabetes mellitus, *Diabetes*. 27: 1098-1104 (1978).
46. Kappy, M.S., Plotnick, L.P., Findlay, J.C., Kayne, R.D. Erythrocyte insulin binding in insulin dependent diabetes mellitus. Lack of relationship to duration and control of diabetes in children and adolescents. *Pediatrics*. 66: 385-390 (1980).

47. Dons, R.F., Ryand, J., Gorden, P., Wachslicht, R., Erythrocyte and monocyte insulin binding in man. *Diabetes*. 30: 896-902 (1981).
48. Okamoto, M., Kuzuga, H., Kuo, P.F., Imura, I. Insulin receptors on erythrocytes and hepatocytes from streptozotocin induced diabetic rats. *Endocrinol. Japon.* 29: 623-630 (1982).
49. Raith, L. "Introduction to radioimmunoassay methods" Byk-Mallinckrodt Radiopharmazeutika-Diagnostika. Germany. 1975. pags. 9-12.
50. Moore, G.E., Ito, E., Ulrich, K., Sanderberg, A.A. Culture of human leukemia cells. *Cancer*. 19: 713(1966).
51. Thorell, J.I., Larson, S.M. "Radioimmunoassay and related techniques". Ed. Mosby. USA. 1978. pags. 205-211.
52. Dobowski, K.M. An ortotoluidina method of body-fluid glucosa determination. *Clin. Chem.* 8: 215 (1962).
53. Bolton, A.E., Hunter, W.M. The labelling of proteins to hight specific radiactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem.J.* 133: 529-539 (1973).
54. Kynoch, P.A.M., Lehmann, H. Rapid estimation (2 1/2 hours) of glycosylated haemoglobin for routine purpose. *The Lancet*. 2: 16 (1977).
55. Tietz, N.W. "Química clínica moderna". Control de calidad. Ed. Interamericana. México. 1972. pags.15-19.
56. Protocolo for the radioimmunoassay of HGH ^{125}I . Cam-

bridge Medical Diagnostics Inc. 1984,

57. Méndez, I., Rodríguez S. Dos ejemplos de aplicación de análisis discriminante en medicina. Comunicaciones Técnicas. Instituto de matemáticas aplicadas y en sistema. UNAM. México. 9 : 1-42 (1978).
58. Angiotensina I radioimmunoassay kit. International CIS. 1984.
59. 17- α -hidroxiprogesterona radioimmunoassay kit. Procedure for quantitative determination of 17- α -hydroxyprogesterone (17-alpha-OH P) an serum or plasma samples. CEA SORIN CIS. International CIS. 1982.