

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

*Tumores de células beta con secreción de proinsulina como causa de hipoglucemia orgánica. Descripción clínica, bioquímica, de patología y posible origen molecular*

**T E S I S D E P O S G R A D O**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO COMO ESPECIALISTA EN

**E N D O C R I N O L O G Í A**

*PRESENTA*

DR. DANIEL CUEVAS RAMOS

**TUTOR: DR. FRANCISCO J GÓMEZ PÉREZ**

MEXICO, D.F., AGOSTO DE 2007



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.

---

**Dr. Luis F. Uscanga Domínguez**  
Director de Enseñanza

---

**Dr. Juan A Rull Rodrigo**  
Profesor Titular del Curso de Endocrinología

---

**Dr. Francisco J Gómez Pérez**  
Director de Tesis  
Jefe del Departamento de Endocrinología

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

Estos han sido años muy gratificantes. Mis maestros me orientaron para integrarme paso a paso a la forma más adecuada de trabajo. Las inquietudes empezaron a surgir, las transformamos en ideas, las llevamos a cabo y paulatinamente se han ido concretando, mediante el camino del esfuerzo y la motivación constante, en proyectos de investigación clínica.

El importante respaldo de mis compañeros residentes, de mi padre y de Xeily, ha sido y seguirá siendo fundamental.

Aunque los resultados de este trabajo resultan interesantes y es recomendable darlos a conocer, pienso que la importancia no está dada por los hallazgos en sí mismos. Considero que lo verdaderamente relevante radica en dar a conocer los resultados de la enseñanza que he recibido en la convivencia diaria con un grupo de investigadores -mis maestros- del más alto nivel académico que, para mi fortuna, me compartieron sus conocimientos, experiencia, apoyo y amistad.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

## **La mística del Instituto**

- Entrega del pensamiento y la acción sin límite de tiempo.*
- Imprimir profundo sentido humano a la atención de los enfermos.*
- Mantener permanente apego a la más estricta ética profesional.*
- Luchar por el prestigio de la Institución antes del propio.*
- Sentir orgullo de pertenecer a la Institución.*
- Sentir a la Institución como el Alma Mater que alimenta nuestro espíritu con la Ciencia y señala los caminos que nos hacen personas más creativas y humanas.*
- Establecer lazos afectuosos de amistad con los compañeros de trabajo.*
- Contribuir intencionadamente a mantener el ambiente de amable convivencia y respeto entre los que en ella laboran.*
- Favorecer la devoción, cariño y respeto de la Institución que nos formó.*
- Procurar que el esfuerzo que cada cual realiza en la Institución contribuya a la solución de los problemas nacionales de salud.*
- Conservar a lo largo de la vida el apego a todos los principios enunciados.*

**Dr. Salvador Zubirán Anchondo**

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
RESUMEN	6
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
CONVERTASA DE PRO-PROTEÍNAS 1/3 (PC1/3)	9
PAPEL DE LA GLUCOSA EN LA EXPRESIÓN DE LA PC2 Y PC1/3	11
<b>PACIENTES Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
¿POR QUE SE REALIZÓ CTOG A CADA PACIENTE?	13
ENSAYOS DE INSULINA, PROINSULINA, PÉPTIDO C Y GLUCOSA	13
CURVA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA (CTOG)	14
PRUEBA DE AYUNO DE 72-HORAS	14
WESTERN BLOT	14
PROCEDIMIENTOS DE LOCALIZACIÓN	15
RESECCIÓN QUIRÚRGICA Y HALLAZGOS DE PATOLOGÍA	16
<b>RESULTADOS</b>	<b>16</b>
PRUEBA DE AYUNO DE 72-HORAS	16
CURVA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA (CTOG)	17
CTOG DESPUÉS DE 4 MESES DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO	18
INMUNOHISTOQUÍMICA	18
WESTERN BLOT	21
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>29</b>

## ***Tumores de células beta con secreción de proinsulina como causa de hipoglucemia orgánica. Descripción clínica, bioquímica, de patología y posible origen molecular.***

*Francisco J Gómez Pérez<sup>1</sup>, Daniel Cuevas Ramos<sup>1</sup>, Paloma Almeda Valdés<sup>1</sup>, Xeilly Zárate Díaz<sup>2</sup>, Alejandro Zentella Dehesa<sup>3</sup>, José Luis Ventura Gallegos<sup>4</sup>, Roopa Mehta<sup>1</sup>, Norma Uribe Uribe<sup>5</sup>, Juan A Rull<sup>1</sup>.*

*<sup>1</sup>Departamento de Endocrinología y Metabolismo, INCMNSZ; <sup>2</sup> Departamento de Cirugía, INCMNSZ; <sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, INCMNSZ; <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; <sup>5</sup>Departamento de Patología, INCMNSZ.*

### **Resumen**

**Objetivo:** Los objetivos del estudio son: 1) describir las dificultades en el diagnóstico de hipoglucemia orgánica secundaria al uso de ensayos altamente específicos de insulina en tumores de células beta con secreción autónoma de proinsulina (proinsulinomas); 2) demostrar la secreción autónoma de proinsulina, y no así de insulina, en los pacientes con proinsulinomas; 3) estudiar la etiología del exceso de secreción de proinsulina en este tipo de tumores.

**Métodos:** se estudiaron cinco pacientes con hipoglucemia orgánica utilizando un ensayo altamente específico para insulina y proinsulina. En todos los casos se realizó prueba de ayuno. Además, se tomaron muestras de sangre para medición de insulina, proinsulina y glucosa durante curva de tolerancia a la glucosa oral de 5 horas (CTOG) antes (en los casos 2 a 5) y 4 meses después (en los casos 2 y 4) del tratamiento quirúrgico. En todos los casos se realizó tinción de inmunohistoquímica con insulina y proinsulina. Para estudiar la expresión de la pro-conversata de hormonas 1/3 (PC1/3) se realizó análisis de Western blot en el caso número 4.

**Resultados:** Durante la prueba de ayuno, la hipoglucemia sintomática se presentó en todos los casos. En el momento de la hipoglucemia, la insulina permaneció elevada sólo en el caso número 5. En los otros cuatro pacientes, la insulina disminuyó  $<6 \mu\text{U/ml}$ , dificultando el diagnóstico. En estos casos, la proinsulina permaneció constantemente elevada ( $>95 \text{ pmol/L}$ ). Durante la CTOG se identificaron tres pacientes (casos 2 a 4) con secreción predominante de proinsulina (SPP). Como era de esperarse, el estímulo con la carga de glucosa también ocasionó liberación de insulina, sin embargo, dicha secreción permaneció acorde con los niveles de glucosa (relación insulina/glucosa  $< 0.3$ ), sugiriendo que está determinada por el tejido pancreático normal. Acorde con lo anterior, cuando se presentó hipoglucemia en la quinta hora del estudio, la insulina disminuyó por debajo de  $7 \mu\text{U/ml}$ . En estos pacientes (con SPP), la proinsulina permaneció elevada durante toda la CTOG, incluso, en el momento de hipoglucemia. Por ello, en los casos 2 a 4 se diagnosticó tumor de células beta con secreción autónoma de proinsulina, o bien, proinsulinomas. Por otro lado, en el paciente número 5, la carga de glucosa ocasionó liberación tanto de insulina como de proinsulina. A diferencia de los casos con proinsulinomas, la secreción de insulina fue autónoma y permaneció elevada a pesar de hipoglucemia. Aunque la liberación de proinsulina también incrementó, dicha liberación fue menor en comparación con los casos con proinsulinomas, sugiriendo que provenía del tejido pancreático normal. En este caso la relación insulina/glucosa fue anormal ( $>0.3$ ). Por ello, en este caso se diagnosticó tumor de células beta con secreción autónoma de insulina, o bien, insulinoma típico. Utilizando inmunohistoquímica se demostró mayor

intensidad en la tinción de proinsulina que de insulina en los cuatro pacientes con proinsulinomas, sugiriendo que el producto tumoral principal es la proinsulina. A su vez, en el paciente con insulinoma, la tinción con inmunohistoquímica para insulina fue más intensa que la proinsulina, sugiriendo que el producto tumoral principal es la insulina. En todos los casos, el control de la tinción en los islotes pancreáticos del páncreas normal fue de la misma intensidad. En el análisis del proinsulinoma (caso 4) con Western blot demostró la presencia de la banda de señalización de PC1/3 en tejido tumoral así como en los tres controles (cultivo células RINmsf, páncreas normal de ratón y páncreas normal humano del mismo caso 4). Sin embargo, llamó la atención la presencia de una banda de señalización de menor peso molecular (~85 kDa) que la PC 1/3, presente únicamente en el proinsulinoma. Aunque no concluyente, dicho resultado sugiere la presencia de una proteína truncada con menor actividad enzimática que sea incapaz del procesamiento normal de proinsulina a insulina, acumulándose la pro-hormona. De confirmarse, este resultado podría explicar la mayor secreción de proinsulina en este tipo de tumores.

**Conclusiones:** Se realizaron las siguientes conclusiones: 1) la alta especificidad de los ensayos de insulina complican el diagnóstico de proinsulinomas; 2) la medición de proinsulina puede determinar la etiología de hipoglucemia orgánica en pacientes con tumores de células beta y niveles de insulina normales o casi normales; 3) existen ambos, tanto insulinomas típicos como tumores de células beta con secreción autónoma de proinsulina, los llamados *proinsulinomas*; 4) existen diferencias en la síntesis de proinsulina e insulina dentro del tumor, lo cual, determina la secreción hormonal predominante. Dicha distinción es detectable mediante inmunohistoquímica; y 5) en los proinsulinomas, la mayor liberación de proinsulina parece estar relacionada a la expresión anormal de la PC 1/3 (PC1) en el tejido tumoral, lo cual, es posible que impida el procesamiento normal de proinsulina a insulina. Queda pendiente esclarecer con precisión que tipo de alteración presenta la enzima.



## Introducción

Durante la prueba de ayuno de 72 horas, el diagnóstico de insulinoma se establece al encontrar elevada la concentración de insulina en presencia de hipoglucemia (glucosa < 50 mg/dl) [1]. Esto muestra que el tumor es funcionalmente autónomo pues el descenso de la secreción de insulina es la respuesta esperada a la reducción en los niveles séricos de glucosa. La prueba de ayuno se desarrolló cuando los ensayos de insulina medían no solo insulina, sino también, proinsulina y péptido C (Figura 1).



**Figura 1.** En el pasado, los ensayos de insulina medían no solo insulina, sino también proinsulina y péptido C además de otros fragmentos proteínicos menos procesados. Todos ellos eran reportados como "insulina". Los ensayos más recientes altamente específicos miden insulina intacta y no incluyen a la proinsulina y péptido C en su inmunoreactividad [2,4].

Los nuevos ensayos altamente específicos de insulina [2-4] pudieran ser considerados como un avance tecnológico para el diagnóstico de los insulinomas. Este principio se cumpliría siempre y cuando la mayoría de los

tumores de células beta fueran productores de insulina. No obstante, en publicaciones recientes [5-9] los tumores de células beta productores de proinsulina han mostrado producir hipoglucemia orgánica. Nos referiremos a estos tumores como *proinsulinomas* con el objetivo de diferenciarlos de los *insulinomas típicos*. Cuando la hipoglucemia orgánica se debe a un proinsulinoma, los niveles de insulina se encuentran apropiadamente bajos o francamente disminuidos. Sin embargo, cuando se miden los niveles de proinsulina, los resultados son considerablemente elevados e independientes a las concentraciones de glucemia. Con esto en mente, se estudiaron cuatro casos de hipoglucemia orgánica que parecían estar causados por secreción autónoma de proinsulina y no de insulina. Los cuatro casos fueron un reto diagnóstico pues inicialmente se utilizó un ensayo altamente específico de insulina.

#### *Convertasa de pro-proteínas 1/3 (PC1/3)*

Las convertasas de pro-proteínas (PCs) son proteasas de serina similares a subtilisina implicadas en la maduración de numerosas moléculas biológicamente activas. Actúan mediante la ruptura de los precursores en residuos aminoácidos clave. En la actualidad, se han identificado siete miembros de esta familia y de las cuales, la PC1/3 (también llamada PC1) y la PC2, son las principales enzimas en los gránulos secretores de células endocrinas y neuroendocrinas. Ambas actúan en concierto permitiendo la maduración de precursores hormonales como son el proglucagon, la proopiomelanocortina y la proinsulina.

<b>Convertasa</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Cromosoma</b>
<b>PC1/3 (PC1)</b>			
Humano	753	~ 80 kDa	5q15q21
Ratón	753	~ 80 kDa	13
<b>PC 2</b>			
Humano	638	~ 66 kDa	20p11.2
Ratón	637	~ 65 kDa	2

Tanto la PC2 y la PC1/3 son necesarias para el procesamiento de la proinsulina. Estudios iniciales mostraron que la PC2 tenía la función de realizar la ruptura selectiva del péptido C en la cadena A, mientras que la PC1/3 preferentemente rompía el péptido C de la cadena B. Sin embargo, resultados subsecuentes indicaron que ambas convertasas eran capaces de romper ambos sitios cuando se encontraban presentes en niveles suficientes. El orden de acción de la PC2 y PC1/3 en la conversión de proinsulina a insulina ha sido cuidadosamente estudiado. Rhodes y colaboradores [10] demostraron que la PC2 prefiere el intermediario de proinsulina que ha sufrido ruptura en el péptido C unido a la cadena B (des-31,32 proinsulina). Esta observación ha llevado al esquema de la figura 2, en el cual la PC1/3 actúa primero para generar el sustrato des-31,32 proinsulina que después sufrirá el procesamiento por la acción de la PC2. Es posible que, por lo tanto, la PC1/3 alcance su forma activa más rápido que la PC2, la cual, requiera un pH más elevado como óptimo. Así, la PC1/3 inicia el procesamiento de proinsulina desde la región trans del aparato de Golgi en gránulos secretores muy tempranos y ácidos, mientras que la PC2 actúa únicamente en gránulos maduros y menos ácidos. Acorde con este esquema, pareciera que la PC1/3 juega un papel más importante en el procesamiento de la proinsulina. Esta suposición surge de observaciones realizadas en ratones modificados genéticamente para que carezcan de PC2 o PC1/3. En extractos pancreáticos de ratones sin PC2, la inmunoreactividad para proinsulina es del 31% mientras que en ratones sin PC1/3 la inmunoreactividad para proinsulina es del 87% [11]. En la actualidad se concluye que un tercio de la proinsulina es procesada por la PC2 y por lo tanto, el restante 70% del procesamiento se realiza por la vía de PC1/3 (Figura 2).

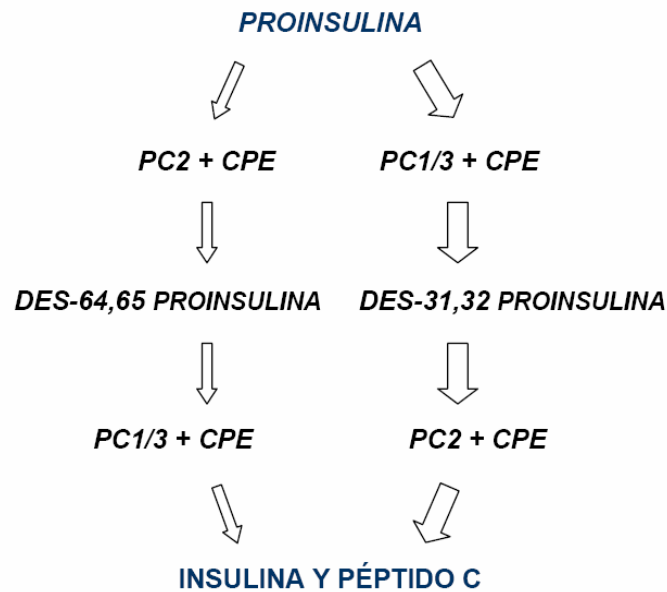
Una observación clínica importante fue demostrar que el sustrato de la PC2, la des-31,32 proinsulina, es el principal intermediario similar a proinsulina circulante en humanos. Aunque esto podría sugerir que existe un defecto en la actividad de PC2 que ocasiona el aumento en sangre del sustrato, esto no es así. En cultivos de islotes pancreáticos humanos se ha reportado que la conversión de proinsulina a insulina produce un aumento importante de des-31,32 proinsulina a pesar de que los niveles de PC2 son normales. Por otro lado, en ratones sin PC2, el sustrato des-31,32 proinsulina alcanza sólo el 15 a

20% del material inmunoreactivo detectable, o en otras palabras, aún en ausencia total de PC2 el aumento del intermediario des-31,32 proinsulina no es significativo. Este fenómeno se explica por la preferencia tanto de PC2 como de PC1/3 por un residuo básico presente únicamente en la cadena B del péptido C unido a proinsulina. En efecto, esto produce un desequilibrio en la susceptibilidad del sustrato para ser procesado por cualquiera de las dos convertasas, favoreciendo su acumulación. Por ello, el aumento de este intermediario en humanos no es reflejo de deficiencia o ausencia de PC2, sino únicamente de la preferencia de las convertasas de pro-hormonas por cierta secuencia de aminoácidos en los sitios proteolíticos de la proinsulina humana. A pesar de que, al parecer, la des-31,32 proinsulina es procesada preferentemente por la PC2, el papel de la PC1/3 no es despreciable. Con ello, se puede concluir que la PC1/3 juega un papel fundamental en el procesamiento de proinsulina a insulina, tanto en gránulos tempranos dentro del aparato de Golgi, como en los gránulos secretores maduros. Asimismo, la PC2 actúa principalmente en gránulos maduros pues el pH más ácido de los gránulos inmaduros impide su acción. Por todo lo anterior, se considera a la PC1/3 a la convertasa de las células beta más importante para el procesamiento de la proinsulina a insulina, a pesar de que el principal sustrato circulante en humanos es metabolizado preferentemente por la PC2. Basándose en esta información, se postuló el posible papel de la PC1/3 en tumores de células beta con producción autónoma de proinsulina, en los cuales, pudiera existir ausencia o menor actividad de la enzima.

#### *Papel de la glucosa en la expresión de la PC2 y PC1/3*

Estudios en la regulación de la biosíntesis de PC2 y PC1/3 en células beta sugieren que el estímulo en agudo de glucosa aumenta los índices de traducción de ambas enzimas, aumentando el procesamiento de proinsulina a insulina [12,13]. Basándose en la hipótesis previamente expuesta, el estímulo de glucosa en pacientes con proinsulinomas no ocasionaría el efecto esperado. La expresión de la PC1/3 no aumentaría ya sea por su ausencia o por un posible defecto en la proteína. Por lo tanto, la proinsulina no podría procesarse a insulina y ante el estímulo de glucosa, el tejido tumoral liberará en su gran mayoría si no es que exclusivamente, proinsulina. Sin embargo, este defecto

no es esperable que esté presente en las células beta del páncreas normal. Por ello, ante el estímulo de glucosa, el tejido pancreático sano liberará insulina y la cual tendrá el comportamiento esperable acorde a los niveles de glucosa, conservándose intacta la relación insulina/glucosa. De esta forma, se trató de demostrar que los tumores de células beta en estudio producen proinsulina, y no así insulina, de forma autónoma.



**Figura 2.** Rutas del procesamiento de proinsulina en la célula beta del páncreas. Bajo condiciones normales, la vía descrita a la derecha es la más dominante (expresado con flechas más anchas) porque el sustrato des-31,32 proinsulina es el preferido para PC2. Sin embargo PC2 es una enzima de maduración más lenta que retrasa su actividad durante las fases iniciales del procesamiento y la retrasa hasta los gránulos secretorios ya maduros. PC = pro-convertasa; CPE = carboxipeptidasa E. [14]

## **Pacientes y Métodos**

Se estudiaron los últimos cinco pacientes con el diagnóstico de hipoglucemia orgánica secundaria a tumor de células beta en el INCMNSZ. A todos los casos se les realizó prueba de ayuno, además, se realizó curva de tolerancia a la glucosa oral de 5 horas de duración antes (a los casos 2 a 5) y 4 meses después (casos 2 y 4) del tratamiento quirúrgico. Durante estos estudios se midió glucosa, insulina y proinsulina y sólo durante la prueba de ayuno se cuantificó el péptido C (excepto en el caso 1).

### *¿Por que se realizó CTOG a cada paciente?*

Como se comentó, la glucosa es un potente estímulo para el procesamiento de proinsulina a insulina. En pacientes con proinsulinomas, la proinsulina no podrá procesarse a insulina y ante el estímulo de glucosa, el tejido tumoral liberará predominantemente proinsulina. Sin embargo, el defecto del procesamiento no es esperable que esté presente en las células beta del páncreas normal, ni en pacientes con insulinoma típico. Por ello, ante el estímulo de glucosa, el tejido pancreático sano liberará insulina y la cual tendrá el comportamiento esperable acorde a los niveles de glucosa, conservándose normal la relación insulina/glucosa. Asimismo, en pacientes con insulinoma típico, la liberación de proinsulina será menor que en los pacientes con proinsulinomas pues es esperable que con el estímulo de glucosa, la mayoría de la proinsulina será procesada a insulina. De esta forma, se trató de demostrar que los tumores de células beta en estudio pueden producir proinsulina o insulina, de forma autónoma.

### *Ensayos de insulina, proinsulina, péptido C y glucosa*

Se utilizó un ensayo monoclonal altamente específico para insulina (Microparticle Enzyme Immunoassay, MEIA, Abbott Laboratories) con menos de 0.005% de reacción cruzada con proinsulina y sin reacción cruzada con péptido C. El rango normal en ayuno es 7.1 – 15.6  $\mu\text{U/ml}$  (50.9 – 111.9 pmol/l). La proinsulina fue medida con un ensayo altamente específico por ELISA con dos sitios de unión. El rango normal en ayuno es de 1.8 – 18.0 pmol/L. El límite bajo de detección es de 0.5 pmol/L. El péptido C sérico se midió con ensayo de inmunoquemiluminiscencia (ICMA, Bayer laboratories) con rango normal en

ayuno entre 0.8 – 3.9 ng/ml. El valor más bajo de detección es 0.01 ng/ml. La glucosa plasmática fue medida con el método de glucosa-oxidasa con el método Synchron LX (Beckman Coulter, Inc.) con el rango normal de 74 – 106 mg/dl.

#### *Curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG)*

Después de 8 horas de ayuno, se administró 75 gramos de glucosa por vía oral en 5 minutos. Se tomaron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 minutos. El suero fue separado en una centrífuga refrigerada y se congeló a menos 20° C hasta el análisis. La glucosa e insulina fueron medidas en nuestro laboratorio, mientras que la proinsulina y el péptido C se midieron en *Specialty Laboratories* (27027 Tourney Road Valencia, CA 91355, USA). En los casos 2 y 4, se repitió la CTOG después de 4 meses del tratamiento quirúrgico. Se midió glucosa, insulina y proinsulina en los tiempos señalados.

#### *Prueba de ayuno de 72-horas*

Se siguió el protocolo estándar en los cinco pacientes [1]. Los pacientes estuvieron en ayuno hasta demostrarse la triada de Whipple la cual ocurrió a las 14, 18, 22, 7 y 6 horas, en los casos 1 a 5, respectivamente. Se consideró hiperinsulinemia cuando los niveles de insulina eran  $>6 \mu\text{g/ml}$  en presencia de hipoglucemia (glucosa  $<50 \text{ mg/dl}$ ). Se consideró una razón insulina/glucosa normal con resultado  $< 0.3$  [15].

#### *Western blot*

Se realizó análisis en cultivo de células RINmsf, páncreas de ratón normal, páncreas humano normal y en tejido de tumor de células beta (proinsulinoma). Todos los tejidos mencionados fueron congelados en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extracción.

*PC 1/3:* Las células se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron en un amortiguador de lisis conteniendo inhibidores de proteasas  $10 \mu\text{g/ml}$  de leupeptina,  $10 \mu\text{g/ml}$  de aprotinina y  $1 \text{ mM}$  de PMSF (SIGMA, USA). Las células se rasparon con un gendarme y se centrifugaron a  $14000 \text{ rpm}$  en una microcentrífuga *Eppendorf* durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se

almacenó a -20°C hasta el momento de su uso. Las proteínas (100µg) obtenidas fueron separadas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE al 10%) a 80 volts por 3 a 4 horas con transferencia durante la noche a 12° C y 30-50 volts [16]. Las proteínas separadas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (MSI, USA) según el método empleado por Towbin [17]. Las membranas se bloquearon por 1 hora con TBS-Tween 0.1% conteniendo 5% de leche descremada (Svelty de Nestlé) y se incubaron 1.5 horas con anticuerpos específicos contra la PC1/3 (Abcam, USA). Se lavaron con TBS-Tween al 1% BSA o al 3% después de incubación durante la noche de 12 a 16 horas a 4° C. Se lavaron 4 veces durante 15 minutos por ocasión. Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón-HRP (dilución 1:10,000) que también se lavaron con TBS-Tween-Leche 5%. Las proteínas se evidenciaron mediante el reactivo de Supersignal (Pierce, GB), el cual proporcionó sustrato para la peroxidasa y luminol para producir quemiluminiscencia y un estabilizador para prolongar la emisión de luz. La quemiluminiscencia se evidenció en una película Kodak sensible al azul, la cual es especial para este tipo de emisión.

*Proteína actina:* para normalizar el cargado de la proteína PC 1/3 se evaluaron los niveles de actina presentes en los extractos proteicos. Se utilizó la misma cantidad de proteína total y anticuerpo anti-actina. Dicho anticuerpo reconoce a todas las subunidades de la proteína (dilución 1:10,000) y fue donado por el Dr. Manuel Hernández del CINVESTAV-IPN [18]. Las condiciones del Western blot fueron similares como las descritas previamente. Se utilizó el mismo anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dilución 1:10,000).

#### *Procedimientos de localización*

En el caso 1, se realizó tomografía de abdomen con la cual se identificaron múltiples lesiones pancreáticas hipervasculares (al menos cuatro entre la cabeza y el cuerpo del páncreas). En el transoperatorio, el ultrasonido mostró lesiones adicionales a lo largo de toda la glándula, incluyendo la cabeza. Se realizó pancreatometomía parcial y enucleación selectiva de las lesiones en la cabeza del páncreas. En la evolución postoperatoria se diagnosticó diabetes dependiente de insulina. En este caso, también se diagnosticó hiperparatiroidismo primario por lo que se está realizando estudio familiar y



genético por la posibilidad de neoplasia endocrina múltiple tipo 1. En los casos 2 a 5, se realizó resonancia magnética y ultrasonido transendoscópico, con lo cual se encontraron lesiones entre el cuerpo y cola, así como en la cabeza y en el cuello del páncreas, respectivamente.

#### *Resección quirúrgica y hallazgos de patología*

En los casos 2, 3 y 5 se realizó enucleación quirúrgica de los tumores vía laparoscópica. Los tumores del caso 1 y 4 se resecaron con laparotomía abierta. En los cinco pacientes la evolución fue satisfactoria sin complicaciones y hasta el momento no se han presentado recaídas. En todos los tumores, se realizó inmunohistoquímica para insulina y proinsulina.

## Resultados

En la tabla 1 se muestran las características clínicas de los cinco pacientes. En la tabla 2 se resumen los valores de insulina, proinsulina y péptido C durante las CTOG y las pruebas de ayuno. En la tabla 3 se comparan los resultados de las CTOG antes y 4 meses después de la cirugía en los casos 2 y 4.

### *Prueba de ayuno de 72 horas*

El ayuno prolongado ocasionó hipoglucemia sintomática ( $34.6 \pm 11.6$  mg/dl) después de 14, 18, 22, 7 y 6 horas en los casos 1 a 5, respectivamente. El caso 5 fue el único en el cual la insulina permaneció elevada durante la prueba ( $42.0 \pm 4.5$   $\mu$ U/ml), a pesar de hipoglucemia, con una relación insulina/glucosa de  $0.92 \pm 0.22$  (normal  $< 0.3$ ). Con estos resultados se realizó el diagnóstico de insulinoma típico. En los otros cuatro pacientes, la insulina disminuyó a  $< 6$   $\mu$ U/ml ( $5.3 \pm 0.90$   $\mu$ U/ml), lo cual dificultó el diagnóstico. En estos casos la proinsulina persistió elevada durante el ayuno, con valores promedio de  $123.6 \pm 57.1$  (normal  $< 18$  pmol/L), a pesar de hipoglucemia ( $40.3 \pm 1.31$  mg/dl) (Tabla 2). La relación insulina/glucosa fue menor a 0.16 en los cuatro pacientes ( $0.12 \pm 0.02$ , normal  $< 0.3$ ). En los casos 1 a 4 se sospechó el diagnóstico de proinsulinoma. El resultado de péptido C fue normal alto en el caso 2 ( $3.3 \pm 0.7$  ng/ml) y elevado en el caso 3 ( $4.4 \pm 1.7$  ng/ml), en el caso 4 ( $5.8 \pm 3.4$ ), y en el caso 5 ( $5.5 \pm 3.1$  ng/ml, normal entre 0.8 – 3.9 ng/ml). En el caso 1, los niveles de péptido C no se lograron cuantificar. En todos los pacientes, los niveles de insulina y proinsulina sérica regresaron a lo normal después de cirugía.

**Tabla 1. Características basales de los pacientes estudiados.**

<b>Característica</b>	<b>Paciente</b>				
	<b>1*</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Género</b>	M	M	H	M	M
<b>Edad (años)</b>	21	58	45	46	42
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25	29	31	25	30
<b>Tiempo de evolución (meses)</b>	48	24	2	60	24
<b>Clínica predominante</b>	N + A	N	N	N	N
<b>Procedimiento quirúrgico</b>	PP	E	E	PP	E
<b>Número de tumores</b>	8	1	1	1	1
<b>Tamaño del tumor (centímetros)</b>	0.2-1.5	2	2	2.5	1.45
<b>Diagnóstico final</b>	P	P	P	P	I

\* Posible diagnóstico de neoplasia endocrina múltiple tipo 1. P = Proinsulinoma; I = Insulinoma; M= Mujer; H = Hombre; N = síntomas de neuroglucopenia; A = síntomas adrenérgicos; E = Enucleación; PP = Pancreatectomía parcial.

#### *Curva de tolerancia oral a la glucosa*

En los casos 2 a 4, la administración de glucosa ocasionó secreción predominante de proinsulina y la cual, resultó ser una secreción más elevada al compararse con el caso de insulinoma típico (caso 5) ( $149.13 \pm 45.1$  vs  $72.2 \pm 10.0$ ). También, a la quinta hora de la CTOG, los cuatro pacientes desarrollaron hipoglucemia ( $47.4 \pm 6.5$  mg/dl). En el caso de insulinoma típico (caso 5), el valor de insulina permaneció elevado ( $74.9 \mu\text{U/ml}$ ) mientras que en los tres pacientes con secreción predominante de proinsulina (casos 2 a 4), el valor de insulina disminuyó a  $6.4 \pm 1.1 \mu\text{U/ml}$ . Asimismo, en estos tres pacientes, el valor de proinsulina permaneció elevado durante toda la curva ( $149.1 \pm 45.1$  pmol/L), incluso en la quinta hora ( $137.0 \pm 55.9$ ) cuando se presentó hipoglucemia ( $47.4 \pm 6.5$  mg/dl). Estos resultados se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Niveles de glucosa, insulina, proinsulina y péptido C en los pacientes estudiados durante la curva de tolerancia a la glucosa oral (CTOG) de 5 horas y la prueba de ayuno.**

<i>Resultado</i>	<i>Paciente</i>				
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Diagnóstico final	P	P	P	P	I
<b>CTOG (promedio ± DE)</b>					
Glucosa (mg/dl)	--	133.7 ± 76.2	97 ± 41.2	148.3 ± 67.2	153 ± 77.0
Insulina (µg/dl)	--	52.7 ± 36.7	26.4 ± 25.1	34.3 ± 21.7	131.6±63.9
Relación Insulina/Glucosa	--	0.34 ± 0.12	0.21 ± 0.16	0.20 ± 0.07	0.99 ± 0.42
Proinsulina (pmol/L)	--	133.8 ± 21.5	113.6 ± 27.3	200 ± 0.0*	72.2 ± 10.0
<b>5ta hora de la CTOG</b>					
Glucosa (mg/dl)	--	40	50	52.4	52
Insulina (µg/ml)	--	7.5	6.29	5.30	74.9
Relación Insulina/Glucosa	--	0.18	0.12	0.10	1.44
Proinsulina (pmol/L)	--	118	93	200	77
<b>Prueba de ayuno (promedio ± DE)</b>					
Duración (horas)	14	18	22	7	6
Glucosa (mg/dl)	38.6 ± 8.8	40.1 ± 6.6	41.5 ± 5.2	41.2 ± 19.9	47.2 ± 11.8
Insulina (µg/ml)	5.9 ± 2.7	5.5 ± 1.7	5.9 ± 3.2	4.0 ± 1.7	42.0 ± 4.5
Relación Insulina/Glucosa	0.15 ± 0.09	0.14 ± 0.05	0.13 ± 0.076	0.09 ± 0.01	0.92 ± 0.22
Proinsulina (pmol/L)	73.0 ± 9.2	87.6 ± 11.2	133.9 ± 39.4	200 ± 0.0*	61.5 ± 3.6
Péptido C (ng/ml)	--	3.3 ± 0.7	4.4 ± 1.7	5.8 ± 3.4	5.5 ± 3.1
<b>Resultados al final de la prueba de ayuno</b>					
Glucosa (mg/dl)	30	40	32	20	51
Insulina (µg/ml)	10	5.3	3.4	2.1	42
Relación Insulina/Glucosa	0.33	0.13	0.10	0.10	0.82
Proinsulina (pmol/L)	74	90.9	173.5	200	62
Péptido C (ng/ml)	--	3.5	4.2	3.3	4.9

Niveles normales en ayuno de Insulina: 7.1 – 15.6 µU/ml; Proinsulina: 1.8 – 18.0 pmol/L.; Péptido C: 0.8 – 3.9 ng/ml; Glucosa: 74 – 106 mg/dl; Relación Insulina/Glucosa <0.3. \* Todos los resultados fueron > 200 pmol/L.

### *CTOG después de 4 meses del tratamiento quirúrgico*

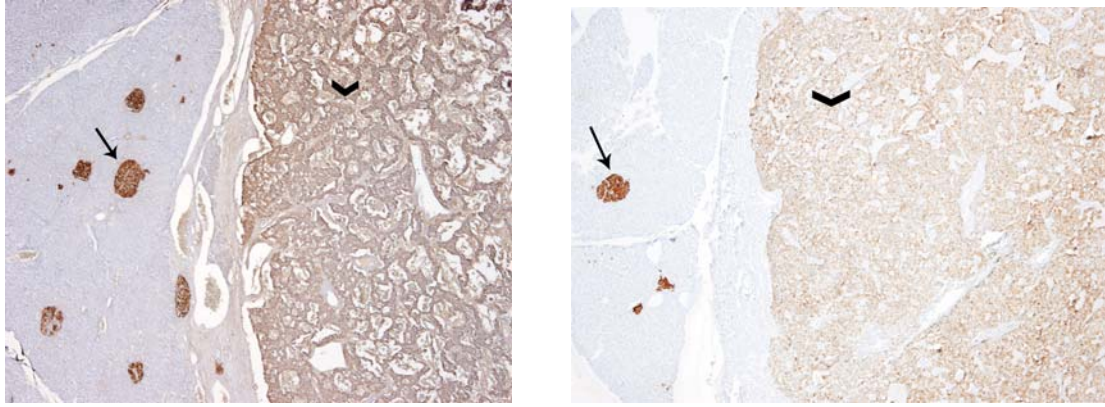
En los pacientes 2 y 4, se realizó CTOG de 5 horas a los cuatro meses después de la intervención quirúrgica. Estos resultados se compararon con la CTOG antes del tratamiento y se resumen en la Tabla 3. Como era de esperarse, en ambos casos la secreción de proinsulina fue considerablemente menor ( $44.7 \pm 57.3$  en el caso 2; y  $10.9 \pm 9.7$  en el caso 4). Asimismo, la relación insulina/glucosa persistió normal ( $0.23 \pm 0.17$  en el caso 2; y  $0.16 \pm 0.15$  en el caso 4).

**Tabla 3. Comparación de los resultados de la CTOG antes y 4 meses después del tratamiento quirúrgico en los casos 2 y 4 con proinsulinomas**

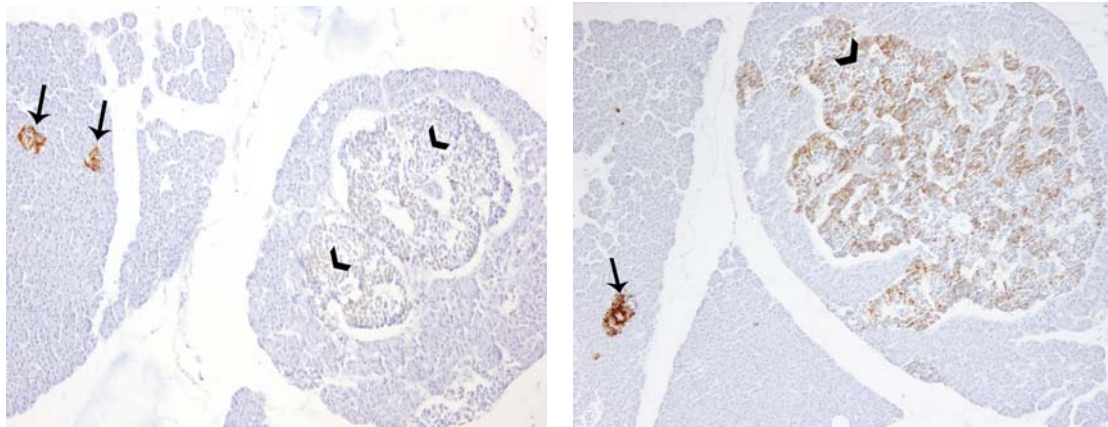
<b>Resultado promedio <math>\pm</math> DE</b>	<b>Antes de Cirugía</b>	<b>Después de 4 meses</b>
<b>Caso 2</b>		
<i>Glucosa (mg/dl)</i>	133.7 $\pm$ 76.2	104.5 $\pm$ 55.05
<i>Insulina (<math>\mu</math>g/ml)</i>	52.7 $\pm$ 36.7	32.1 $\pm$ 35.2
<i>Relación Insulina/Glucosa</i>	0.34 $\pm$ 0.12	0.23 $\pm$ 0.17
<i>Proinsulina (pmol/L)</i>	133.8 $\pm$ 21.5	44.7 $\pm$ 57.3
<b>Caso 4</b>		
<i>Glucosa (mg/dl)</i>	148.3 $\pm$ 67.2	110.0 $\pm$ 34.7
<i>Insulina (<math>\mu</math>g/ml)</i>	34.3 $\pm$ 21.7	23.3 $\pm$ 28.9
<i>Relación Insulina/Glucosa</i>	0.20 $\pm$ 0.07	0.16 $\pm$ 0.15
<i>Proinsulina (pmol/L)</i>	200 $\pm$ 0.0	10.9 $\pm$ 9.7

### *Inmunohistoquímica*

Las imágenes del caso 3 se muestran en la Figura 3A. Es importante notar como los islotes normales en cada imagen (flechas) están teñidos con la misma intensidad. Sin embargo, dentro del tumor (cabezas de flecha), la tinción con proinsulina es claramente más intensa que la tinción con insulina, lo cual sugiere que el principal producto del tumor es proinsulina. Estos hallazgos también se confirmaron en los otros tres pacientes con secreción predominante de proinsulina (casos 1, 2 y 4). A su vez, en el paciente con insulinoma típico (caso 5), la tinción de insulina, y no la de proinsulina, fue la predominante dentro del tumor (Figura 3B).



**Figura 3A. Caso 3 (Proinsulinoma).** Inmunohistoquímica (magnificación 10x) con proinsulina (izquierda) e insulina (derecha) en el tumor del caso 3. Dentro de los islotes pancreáticos normales, la proinsulina e insulina están teñidas con la misma intensidad (flechas). Sin embargo, dentro del tumor (cabezas de flechas), la proinsulina muestra una mayor intensidad que la insulina. Esto sugiere que el principal producto dentro del tumor es proinsulina y no insulina.

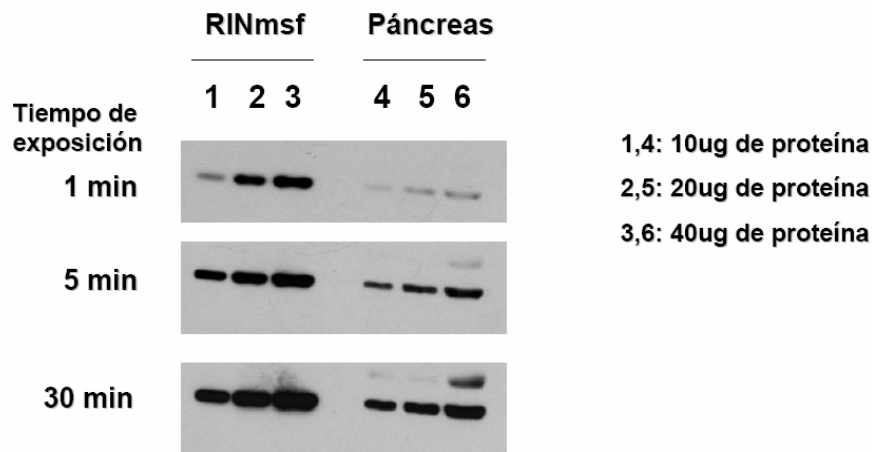


**Figura 3B. Caso 5 (Insulinoma).** Inmunohistoquímica (magnificación 10x) con proinsulina (izquierda) e insulina (derecha) en el tumor del caso 5. Dentro de los islotes pancreáticos normales, la proinsulina e insulina están teñidas con la misma intensidad (flechas). Sin embargo, dentro del tumor (cabezas de flechas), la proinsulina muestra una intensidad muy tenue en comparación con la tinción más fuerte de insulina. Esto sugiere que el principal producto dentro del tumor es insulina y no proinsulina.

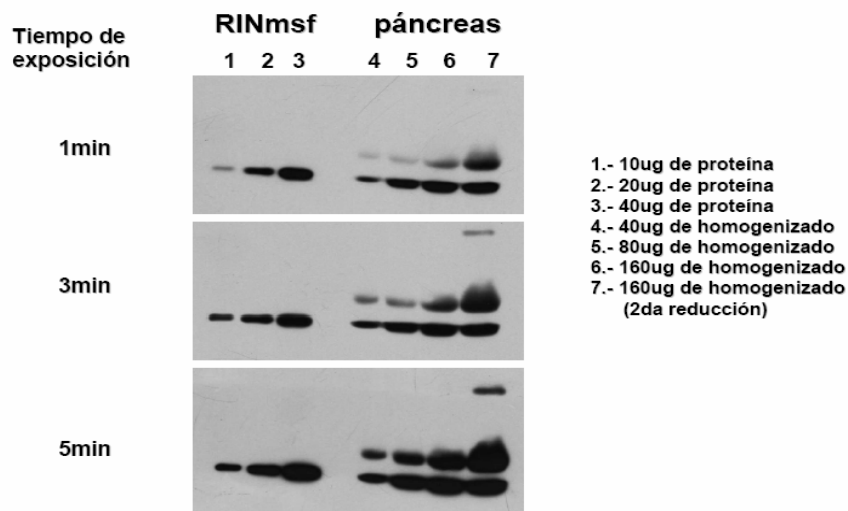
### Western blot

Inicialmente se realizó inmunoblot de actina de extracto de proteínas de la línea celular RINmsf y de un homogenizado de páncreas de ratón. Este es un experimento para determinar el desbalance de proteínas entre la línea celular y el tejido, por la matriz extracelular y hemoglobina. Con estos resultados se logró determinar la cantidad de anticuerpo anti-actina así como la proporción adecuada de cada tejido para obtener una expresión similar. Estos resultados se muestran en la figura 4.

#### **Análisis de expresión de la proteína actina en la línea celular RINmsf y páncreas de ratón**

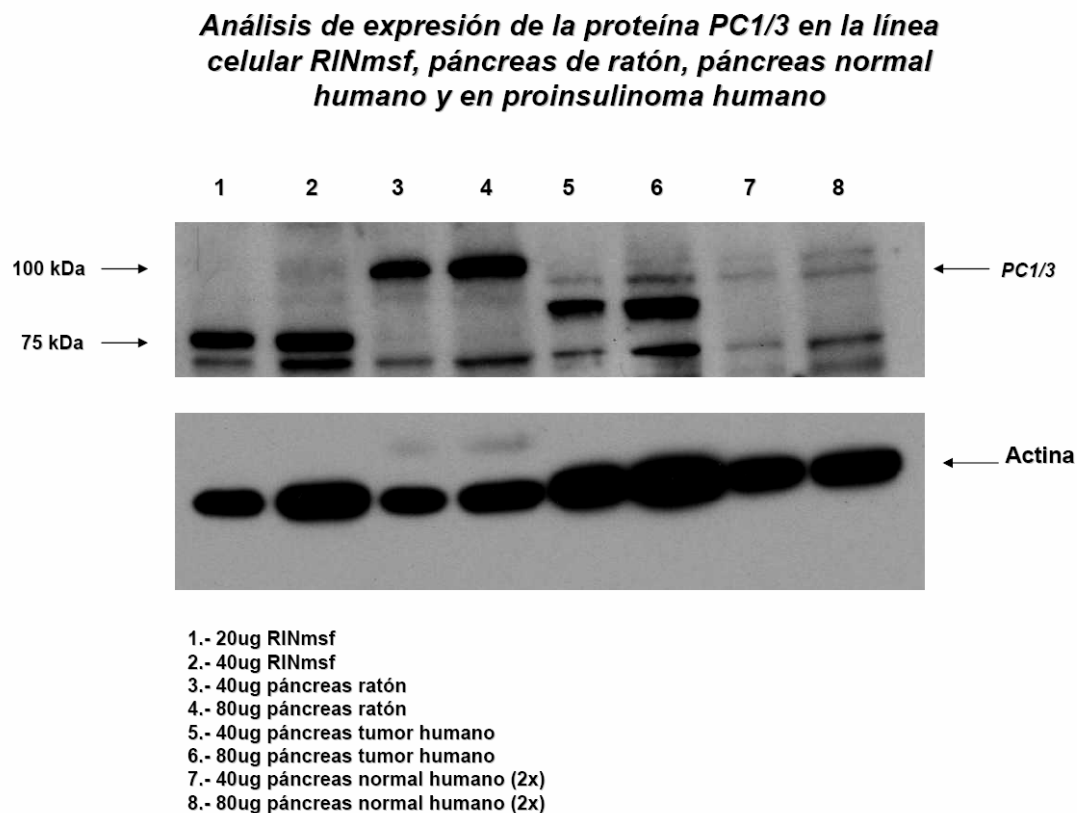


#### **Análisis de expresión de la proteína actina en la línea celular RINmsf y páncreas de ratón**



**Figura 4.** Inmunoblot de actina de extracto de proteínas de la línea celular RINmsf y de un homogenizado de páncreas de ratón. Experimento para determinar el desbalance de proteínas entre la línea celular y el tejido (matriz extracelular y hemoglobina). SDS-PAGE 10%, 3 hr a 80 volts, transferencia a 30 volts toda la noche. Anti-actina 1:500, secundario-HRP anti-ratón 1:10000. Gel de 1mm.

Posteriormente se realizó la primera prueba de anticuerpos contra PC 1/3 a las diluciones recomendadas. Se observaron posibles bandas específicas de PC1/3 con peso de 75 kDa para RINmsf, de 100 kDa para páncreas de ratón y 90 kDa para páncreas normal humano y proinsulinoma humano. Por lo tanto, se demostró que el proinsulinoma tiene positividad para la proteína PC 1/3. Estos resultados se muestran en la Figura 5.

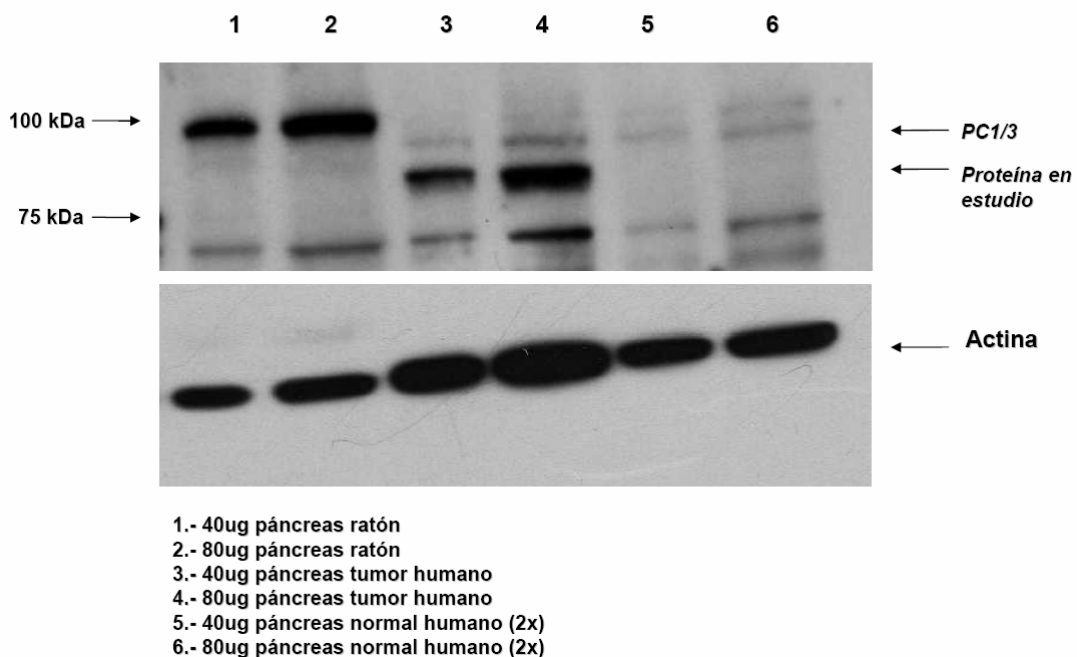


**Figura 5.** Inmunoblot realizado en el día, con 1hr de bloqueo, 2hr de anticuerpo primario (1:500), 1hr de anticuerpo secundario. Para este experimento, el normal humano se duplicó la cantidad de muestra (2x) para lograr una cantidad parecida con el proinsulinoma humano en relación con los niveles de actina. Los resultados se describen en el texto.



Con estos resultados se concluyó la positividad para PC 1/3 en todos los tejidos estudiados, incluyendo en el proinsulinoma. Sin embargo, inesperadamente el anticuerpo anti-PC1/3 mostró una especie inmunoreactiva de ~85 kDa exclusivamente en el tumor pancreático humano (Figura 6).

**Análisis de expresión de la proteína PC1/3 en páncreas de ratón, páncreas normal humano y en proinsulinoma humano**



**Figura 6.** Misma imagen de Inmunoblot que la mostrada en la figura 5. En esta ocasión, se señala la localización de la banda específica de ~85 kDa aproximadamente, a la cual se denominó “proteína en estudio”.

Posiblemente, esta proteína este en relación a una isoforma truncada de PC 1/3 con menor actividad enzimática impidiendo el procesamiento normal de la proinsulina provocando su acumulación y secreción en el tumor de tipo proinsulinoma. Otra posibilidad, aunque menos probable, es que dicha banda de señalización esté en relación con una proteína que interfiera con la función catalítica normal de la PC 1/3. Para definir con mayor precisión este resultado es necesaria mayor investigación.

## Discusión

En la actualidad, es aceptado que existen tumores de células beta con secreción predominante de insulina, o bien, los insulinomas típicos. Por otro lado, existen reportes de casos [5-9] de hipoglucemia por producción excesiva de proinsulina desde un tumor pancreático de células beta. Esta distinción en el patrón de secreción de insulina o proinsulina desde el tumor, es resultado del uso de ensayos altamente específicos para la medición de insulina intacta. En el pasado, los ensayos menos específicos de insulina incluían en su inmunoreactividad a la proinsulina y sus intermediarios, así como al péptido C (Figura 1). La medición de estos péptidos era reportada en conjunto como “insulina” y en pacientes con hipoglucemia orgánica por insulinoma el resultado de insulina se encontraba elevado. Desde 1993, se desarrollaron ensayos altamente específicos para la medición de insulina intacta, excluyendo de la medición a la proinsulina y sus intermediarios, así como al péptido C [2-4]. Inesperadamente, en pacientes con insulinomas, se empezaron a encontrar resultados de insulina normales o incluso apropiadamente bajos para los valores de glucemia. Estos casos han sido reportados en los últimos cinco años [5-9], casos en los que el diagnóstico fue más complicado, incluso en uno de ellos se retrasó hasta 10 años [8]. No obstante, como en el estudio de Gutman en 1970 [19], con el uso de ensayos específicos para insulina intacta se demuestra que algunos tumores de células beta tienen secreción predominante de proinsulina. Asimismo, desde 1975 Alsever et al [20] y más recientemente Kao et al en 1994 [21] y Gorden et al en 1995 [22], demostraron la utilidad de la medición de proinsulina en el diagnóstico de hipoglucemia orgánica secundaria a insulinomas. La sensibilidad de la proinsulina (90%) ha demostrado ser superior a la misma insulina y al péptido C (85%) [21]. Es posible que la mayor utilidad de la medición de proinsulina se deba a que tanto los insulinomas como los proinsulinomas secretan proinsulina. No obstante, usualmente la proinsulina no es incluida en el abordaje diagnóstico de los pacientes con sospecha de hipoglucemia orgánica. Aunado a lo anterior, en este trabajo se reportan cuatro pacientes con tumores pancreáticos productores de proinsulina causantes de hipoglucemia orgánica, o bien, los llamados proinsulinomas.

Los proinsulinomas se caracterizan por secreción autónoma de proinsulina, es decir, independiente a los valores de glucemia, además de niveles de insulina  $< 6 \mu\text{U/ml}$  o, en algunos casos,  $< 3 \mu\text{U/ml}$ , en el momento de hipoglucemia. Ello explica que en los pacientes descritos, la relación insulina/glucosa se haya encontrado normal, es decir,  $< 0.3$ . Como la proinsulina no es usualmente incluida en el abordaje diagnóstico de hipoglucemia orgánica, estos resultados de insulina apropiados para la glucemia del paciente, complica el diagnóstico de insulinoma. En los cuatro pacientes con proinsulinomas reportados en este trabajo (caso 1 a 4) se ilustra dicha dificultad diagnóstica. Fue hasta que se obtuvieron los resultados de proinsulina que se logró realizar el diagnóstico de hipoglucemia orgánica por proinsulinomas. Estos casos se pueden comparar con el caso número 5 con insulinoma típico, en el cual, la insulina constantemente elevada a pesar de la presencia de hipoglucemia, permitió realizar el diagnóstico con menor dificultad. En los tres pacientes con proinsulinomas, la respuesta a la hipoglucemia por parte del tejido pancreático normal fue la esperada, preservándose normal la relación insulina/glucosa. Además, al comparar los resultados de CTOG inicial con los resultados a los 4 meses después del tratamiento quirúrgico en los casos 2 y 4, se demuestra que el exceso de la secreción de proinsulina fue originada por el tumor. Después de la carga de glucosa, la secreción de proinsulina fue considerablemente menor en ambos casos (Tabla 3). La CTOG en los pacientes con proinsulinomas nos permitió identificar: 1) el producto principal del tumor de células beta fue proinsulina; y 2) la secreción de proinsulina, pero no la de insulina, fue independiente a los niveles de glucosa y permaneció alta a pesar de hipoglucemia. Ambas conclusiones son aplicables también a la prueba de ayuno, siempre y cuando la proinsulina se incluya en el abordaje diagnóstico. Es claro que la medición de proinsulina fue de utilidad en el abordaje diagnóstico de hipoglucemia orgánica, particularmente cuando se utilizan ensayos altamente específicos de insulina intacta. Asimismo, en algunas instancias, la realización de CTOG con medición de proinsulina puede llegar a ser de utilidad diagnóstica, por ejemplo, para demostrar la autonomía en la secreción de proinsulina en casos donde la relación insulina/glucosa se encontró inesperadamente normal. Sin embargo, este trabajo no fue realizado

con el objetivo de estudiar el papel diagnóstico de la CTOG en hipoglucemia orgánica y por lo tanto es necesaria mayor investigación al respecto.

Durante la prueba de ayuno de 72 horas, en los pacientes con proinsulinomas (casos 1 a 4) se encontraron niveles de insulina disminuidos ( $< 6\mu\text{U/ml}$ ). Hallazgos similares encontraron Wiesli et al [23] y Vezzosi et al [24], quienes han propuesto un corte de 3 a  $6\mu\text{U/ml}$  para diagnosticar hiperinsulinemia cuando se utilicen ensayos altamente específicos para medición de insulina intacta durante la prueba de ayuno. En efecto, en los pacientes con proinsulinomas es probable que la secreción de insulina se origine de las células beta del tejido pancreático normal y por lo tanto la causa de la hipoglucemia se debe al efecto biológico de la hiperproinsulinemia. La actividad biológica de la proinsulina se estima en sólo el 5 al 10% de la insulina [20]. En los proinsulinomas reportados recientemente [5-9], algunos autores sugieren que este estado hiperproinsulinémico amplifica la actividad biológica de la prohormona y como consecuencia, los niveles de glucosa disminuyen [25]. Esto parece ser una explicación razonable de los hallazgos en nuestros pacientes.

Los resultados de inmunohistoquímica en los cuatro pacientes con proinsulinomas también apoyan la idea de que el principal producto de este tipo de tumores es la proinsulina.

Nos resultó sorprendente que de los últimos cinco pacientes estudiados con hipoglucemia orgánica en el INCMNSZ, cuatro de ellos se les diagnosticó proinsulinoma, y solo en el caso 5, se diagnosticó insulinoma típico. Este hallazgo sugiere que los proinsulinomas son más frecuentes de lo que se pensaba. También, apoya el punto de la utilidad de la medición de proinsulina en el abordaje diagnóstico de hipoglucemia orgánica, particularmente en dos situaciones: 1) cuando en el abordaje se utilicen ensayos altamente específicos de insulina intacta y 2) en pacientes con la relación insulina/glucosa normal en el momento de hipoglucemia.

Finalmente, los resultados de Western blot sugieren que la mayor producción de proinsulina está relacionada con menor expresión y posiblemente actividad de la PC 1/3. Es posible que el exceso de proinsulina se deba a: 1) la presencia de una isoforma truncada de PC 1/3 con peso molecular  $\sim 80\text{ kDa}$ , la cual tiene menor actividad enzimática y es incapaz de lograr el procesamiento normal de la proinsulina; o 2) una proteína estructuralmente similar pero con menor

función catalítica que la enzima en tejido normal. Es importante determinar con precisión el peso molecular de la expresión proteica encontrada en el Western blot. También, confirmar los hallazgos en pacientes futuros con proinsulinomas, analizar la expresión de PC 1/3 en insulinomas típicos así como complementar el estudio con el análisis de la expresión de PC2 en ambos tipos de tumores. Hasta ese momento se podrá definir con precisión el origen molecular de la mayor producción de proinsulina, y no de insulina, como causa de hipoglucemia orgánica. Por el momento, no es posible realizar ninguna otra conclusión. Aún así, es posible mencionar que es clara una diferencia entre el tejido tumoral y el tejido normal. También, es poco probable que el defecto encontrado sea generalizado pues estudios en ratones han demostrado que la ausencia sistémica de PC1/3 produce dwarfismo con múltiples defectos neuroendócrinos de procesamiento [26], características ausentes en los pacientes descritos. Por ello, dicho defecto debe encontrarse sólo en el tumor y ésta anomalía podría llegar a explicar el origen de la hiperproinsulinemia en pacientes con hipoglucemia orgánica secundaria a tumores de células beta con relación insulina/glucosa normal, estudiados con ensayos altamente específicos de insulina intacta, sin inmunoreactividad para proinsulina, sus intermediarios y péptido C.

## Conclusiones

En resumen, podemos concluir lo siguiente: 1) los ensayos altamente específicos de insulina intacta complican el diagnóstico de proinsulinomas; 2) la medición de proinsulina permite determinar la etiología de la hipoglucemia orgánica en pacientes con tumores de células beta e insulina normal o cerca de lo normal; 3) existen tanto insulinomas típicos como tumores de células beta con secreción predominante y autónoma de proinsulina; los llamados proinsulinomas; 4) la determinación de proinsulina sérica ayuda tanto en el diagnóstico como para evaluar la eficacia del tratamiento pues en todos los casos los niveles de proinsulina se normalizaron durante el seguimiento; y 5) Aunque no concluyente, el Western blot demostró la expresión anormal en tejido tumoral de una proteína, posiblemente, con menor actividad enzimática por alteración estructural que impide el procesamiento normal de proinsulina a insulina, acumulándose la pro-hormona. De confirmarse, este resultado podría explicar la mayor secreción de proinsulina en este tipo de tumores.

Por los resultados de este trabajo también se pueden plantear las siguientes interrogantes:

1. Durante la prueba de ayuno además de la medición de insulina, ¿sería conveniente realizar la medición de proinsulina desde un inicio, o únicamente cuando el paciente presenta valores bajos, normales o ligeramente elevados de insulina?
2. ¿Sería conveniente realizar la medición con el ensayo menos específico de insulina, en el cual, se incluye la medición de proinsulina y péptido C?
3. Incluso, ¿sería más recomendable realizar la medición exclusiva de proinsulina en sustitución de la medición de insulina con ensayo altamente específico?
4. En el diagnóstico de hipoglucemia orgánica: ¿qué papel juega la medición de proinsulina durante la CTOG?

## Referencias

1. Service F.J. Hypoglycemic disorders. *New Engl J Med.* 1995;332:1144-1152
2. Andersen L, Dinesen B, Jorgensen PN, Poulsen F, Roder ME. Enzyme Immunoassay for intact human insulin in serum or plasma. *Clin Chem.* 1993; 39:578-582
3. Deberg M, Houssa P, Frank B, Sodoyez-Goffaux F, Sodoyez JC. Highly specific radioimmunoassay for human insulin based on immune exclusion of all insulin precursors. *Clin Chem.* 1998;44:1504-1513.
4. Monti LD, Sandoli EP, Phan VC, et al. A sensitive and reliable method for assaying true human insulin without interaction with human proinsulin-like molecules. *Acta Diabetol.* 1995;32:57-63.
5. Chia Chee W, Saudek Chirstopher D. The diagnosis of fasting hypoglycemia due to an islet cell tumor obscured by a highly specific insulin assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:1464-1467.
6. Piovesan A, Pia A, Visconti G, et al. Proinsulin-secreting neuroendocrine tumor of the pancreas. *J Endocrinol Invest.* 2003;26;8:758-761.
7. Gury H, Rio F, Neamtu D, Bolvin S. Insulinoma with hyperproinsulinemia: a two cases report. *Ann Endocirrol (Paris).* 2002;63:240-242.
8. Czupryniak L, Strzelezyk J, Drzewoski J. Diagnostic difficulties in long-standing insulinoma with near-normal plasma insulin levels. *J Endocrinol Invest.* 2005;28:170-174.
9. Wouters RS, van den Ouweland JM, Pouwels JG, Wolffenbuttel BH. Missed hyperinsulinaemia in a patient with an insulinoma. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2005;149:944-946.
10. Rhodes CJ, Lincoln B, Shoelson SE. Preferential cleavage of des-31,32-proinsulin over intact proinsulin by the insulin secretory granule type II endopeptidase: implications of a favored route for prohormone processing. *J Biol Chem.* 1992;267:22719
11. Zhu X, Orci L, Carroll R, et al. Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lackin prohormone convertasa 1/3. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2002;99:10299

12. Martin SK, Carroll R, Benig M, Steiner DF. Regulation by glucose of the biosynthesis of PC2, PC3 and proinsulin in (ob/ob) mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* 1994;356:279
13. Skelly R, Schuppin G, Ishihara H, et al. Glucose-regulated translational control of proinsulin biosynthesis with that of the proinsulin endopeptidases PC2 and PC3 in the insulin-producing MN6 cell line. *Diabetes* 1996;45:37.
14. Rouillé Y, Duguay SJ, Luna K, et al. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides. *Front Neuroendocrinol* 1995;16:322.
15. Merimee TJ, Tyson Je. Hypoglycemia in man: pathologic and physiologic variants. *Diabetes* 1977;26:161
16. Laemmli U. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Nat Acad Sci.* 1979;76:4350
18. Hernández J, Domínguez M, Palmer E, Saborio L. Interaction of cadmium with actin microfilaments *in vitro*. *Toxicol in vitro* 1989;3:277-284.
19. Gutman R, Lazarus R, Penhos JC, Fajans S, Recant L. Circulating proinsulin-like material in patients with functioning insulinomas. *N Engl J Med.* 1971;284:1003-1008
20. Alsever RN, Roberts P, Gerber JG. Insulinoma with low circulating insulin levels: The diagnostic value of proinsulin measurements. *Ann Intern Med.* 1975;82:347-350.
21. Kao PC, Taylor RL, Service JF. Proinsulin by immunochemiluminometric assay for the diagnosis of insulinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:1048-1051.
22. Gorden P, Skarulis MC, Roach P, Comi RJ, Fraker DL, Norton JA, Alexander HR, Doppman JL. Plasma Proinsulin-Like Component in Insulinoma: a 25-year experience. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2884-2887
23. Wiesli P, Brandle M, Zapf J, et al. Assessment of hyperinsulinaemia at the termination of prolonged fast. *Clin Chim Acta.* 2004;342:227-231.



24. Vezzosi D, Bennet A, Fauvel J, et al. Insulin levels measured with insulin-specific assay in patients with fasting hypoglycemia related to endogenous hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol.* 2003;149:413-419.
25. Wiesli P, Perren A, Saremaslani P, Pfammatter T, Giatgen AS, Schmid Ch. Abnormalities of proinsulin processing in functioning insulinomas: clinical implications. *Clin Endocrinol.* 2004;61:424-430
26. Zhu X, Zhou A, Dey A, Norrbom Ch, Carroll R, Zhang Chunling, Laurent V, Lindberg I, Ugleholdt R, Holst J, Steiner D. Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Nat Acad Sci* 2002;99:10293.