

LA SECRECIÓ D'INSULINA I PÈPTID C DESPRÉS D'UNA SOBRECÀRREGA ORAL DE GLUCOSA EN L'HOME

Comunicació presentada el dia 31 de gener de 1978
a les I Jornades d'Endocrinologia de la S.C.B.

per

R. CASAMITJANA i ABELLÀ i F. RIVERA i FILLAT

Laboratori d'Hormonologia, Departament de Bioquímica, Hospital Clínic i Provincial,
Facultat de Medicina, Barcelona

RESUM

S'han valorat els nivells plasmàtics d'IRI i pèptid C en 16 individus sans en condicions estandaritzades. Es feren determinacions basals i als 30, 60, 90 i 180 minuts després d'una sobrecàrrega oral de glucosa. S'observa una franca correlació ($r=0.78$) entre els valors d'ambdós paràmetres en els distints punts de cada una de les corbes considerades individualment, mentre la correlació no és tan bona ($r=0.62$) quan es consideren globalment totes les dades.

Si bé la secreció pancreàtica d'insulina i pèptid C és equimolecular, els nivells plasmàtics d'aquest darrer són més elevats perquè no es degrada a nivell hepàtic i perquè la seva vida mitjana és més prolongada. A causa d'aquesta condició i al fet que manca d'activitat biològica, el pèptid C no substitueix la determinació d'IRI en el laboratori hormonal de rutina. La principal utilitat clínica d'aquesta anàlisi rau en el fet de ser l'únic índex fidel de secreció insular en aquells pacients que estan rebent insulina exògena, la qual cosa ens podrà permetre l'estudi de la reserva pancreàtica en diabètics tractats amb aquesta hormona. La determinació de pèptid C ha estat també d'utilitat en el diagnòstic de l'insulinoma i s'ha comprovat en aquests casos que la perfusió d'insulina exògena no és capaç de suprimir —com s'esdevé en els normals— els nivells plasmàtics de pèptid C.

1. INTRODUCCIÓ

És un fet ben conegut que la insulina és sintetitzada en les cèl·lules dels illots de Langerhans en forma de proinsulina (fig. 1), polipèptid d'una sola cadena sobre el qual actuen, en la mateixa cèl·lula, uns enzims proteolítics que separen d'aquesta cadena un pèptid intermedi de 31 aminoàcids, el pèptid C i les altres dues cadenes A i B resten unides per dos ponts disulfur bo i constituint la insulina biològicament activa^{17, 18}. Ambdós, la insulina i el pèptid C romanen empaquetats en els grànuls secretoris de les cèl·lules fins al moment en què per emiocitosis passen a la circulació en la proporció estequiomètrica de mol a mol, junt amb una petita quantitat de proinsulina.

Els experiments de biosíntesi *in vitro* duts a terme per incubació d'illots de Langerhans mitjançant la incorporació de leucina o prolina marcades demostraren que, inicialment, l'única cosa que se sintetitzava era proinsulina, però que després d'un període d'incubació apareixien la insulina i el pèptid C en quantitats idèntiques.

Aquestes proporcions es mantenen durant força temps, ço que féu pensar que *in vivo* s'esdevindria un fenomen semblant i es trobaria en la circulació perifèrica una relació mol a mol²⁰.

Aquesta hipòtesi ha estat abandonada posteriorment quan s'ha comprovat de forma experimental que això no era així i ha quedat suggerida l'existència d'altres factors que deurien tenir un paper important a l'hora de determinar els nivells sanguinis. Aquests factors són la diferència en la via metabòlica, en la taxa de degradació i en la distribució perifèrica¹⁹.

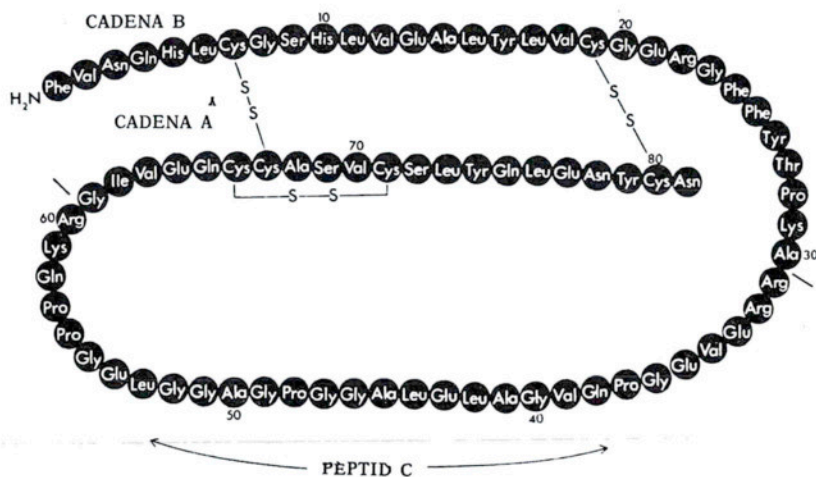


FIG. 1. — Molècula de proinsulina.

Amb aquestes premisses ens proposàrem estudiar variacions en les concentracions plasmàtiques d'insulina i pèptid C produïdes per una sobrecàrrega oral de 100 grams de glucosa, amb una doble finalitat: D'una banda obtenir els nostres perfils de normalitat a fi de poder valorar les possibles patologies. I de l'altra, estudiar comparativament ambdues substàncies i veure si el pèptid C podia substituir la insulina com a indicador de la reserva pancreàtica.

2. MATERIAL I MÈTODE

S'agafaren 25 individus voluntaris, d'edats compreses entre els 20 i els 42 anys, considerats sans segons uns criteris clínics i biològics i prèviament establerts (fig. 2).

Després de l'extracció basal se subministraren 100 g de glucosa oral i es realitzaren noves extraccions als 30, 60, 90, 120 i 180 minuts. La glicèmia es valorà immediatament. La resta del plasma (extret sota heparina 5 U.I./ml) se centrifugà a 4 °C i es congelà a -20 °C fins al moment de la seva determinació.

Requisits previs de normalitat

1. No haver sofert cap malaltia prolongada (crònica o aguda en el terme d'un mes).
2. No tenir antecedents diabètics en dues generacions.
3. No tenir sobrepès.
4. No estar sotmès a cap medicació.
5. No prendre anovulatoris.
6. En cas d'haver tingut fills, que el fetus tingués un pes no superior a quatre quilos.
7. Dieta de 3.000 calories amb 300 grams de carbohidrats durant els tres dies previs a la prova.
8. Repòs nocturn i dejuni de 12 hores.
9. Repòs al llit durant tota la prova.

La glucosa es mesurà pel mètode d'òxido-reducció de la neocuproïna ^{4, 5} adaptat a un autoanaltzador Technicon de flux continu.

La insulina es valorà com a IRI per un mètode de radioimmunoassaig ¹⁶ utilitzant el doble anticòs com a mètode de separació. El material utilitzat fou:

Insulina estàndard de procedència humana.

Insulina-I²⁵, porcina. Puresa: 99 %. Activitat específica: 100 micro Ci/micro g.

Primer anticòs: Obtingut en cobaia; títol final: 1:150.000.

Segon anticòs: Obtingut en conill; títol final: 1:4.000.

Tampó fosfat 0.04 M, pH 7.4, amb 0.1 % de BSA.

El pèptid C es determinà també per ràdio-immunoassaig^{12, 15} i s'utilitzà el segon anticòs com a mètode de separació.

Material emprat en el RIA del pèptid C

Estàndard: Pèptid C de naturalesa sintètica.

Pèptid C-I²⁵: Ac. específica 100 micro Ci/microgr.

Primer anticòs: Obtingut en conill. Títol 1:10.000.

Segon anticòs: Obtingut en cabra. Títol 1:100.

Buffer: Tampó fosfat 0.01 M, pH 7.4.

3. VALORACIÓ DEL MÈTODE

Sensibilitat: Per a la insulina fou de 5 micro U/ml.

Exactitud: Es valorà mitjançant experiments de recuperabilitat amb una oscil·lació per a ambdós entre el 81-94 %.

Especificitat: La valoració d'un sèrum prèviament tractat amb xarcoal donà valors indetectables per a ambdós mètodes.

L'antisèrum de la insulina no té reacció encreuada amb el pèptid C.

L'antisèrum d'aquest tampoc no reacciona amb la insulina. Això no obstant, tots dos reconeixen la proinsulina i hi reaccionen en una proporció del 10-12 %.

Precisió: Calculada mitjançant coeficients de variació, aquests foren: Intraassaig, 4.8 i 5.4 per a la insulina i el pèptid C, respectivament.

Per a l'intraassaig foren de 10.4 per a la insulina i de 11.2 per al pèptid C.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per a la valoració dels resultats es prengué com a punt de partida les dades de la glicèmia, la mitjana més/menys determinà una desviació estàndard de cada punt i es consideraren «no normals» aquelles corbes en les quals existien dos o més punts que sobrepassaven aquests límits.

Aquest criteri acceptat *a priori* per altres autors reduí el nombre de casos a 16. Fou, doncs, a partir d'aquests amb els quals es realitzaren tots els altres càlculs.

Els resultats de cada un dels tres paràmetres els tenim en el requadre següent (fig. 2), i el seu rang és molt semblant al trobat per la majoria dels autors.

Temps (mn)	Glicèmia (mg/l) M ± SD	Insulina (ng/ml) M ± SD	Pèptid C (ng/ml) M ± SD
0	94.4 ± 12.2	0.51 ± 0.14	2.10 ± 0.54
30	142.7 ± 38.1	2.49 ± 1.31	5.85 ± 2.32
60	130.7 ± 40.7	2.78 ± 1.44	7.14 ± 1.90
90	117.7 ± 35.3	2.24 ± 0.84	6.88 ± 1.65
120	108.5 ± 23.4	1.80 ± 0.87	6.70 ± 1.76
180	91.3 ± 14.9	1.25 ± 0.81	5.34 ± 1.78

FIG. 2.— Resultats de glicèmia, insulina i pèptid C en 16 individus normals després d'una sobrecàrrega oral de glucosa.

La representació gràfica d'aquests resultats queda reflectida a la figura 3. Si en lloc de representar-los en valors absoluts ho fem en increments relatius —considerats aquests sobre el valor basal— veurem com petites variacions en la glucosa produeixen grans augments en la secreció d'insulina i una descàrrega una mica menor al pèptid C (figs. 3 i 4).

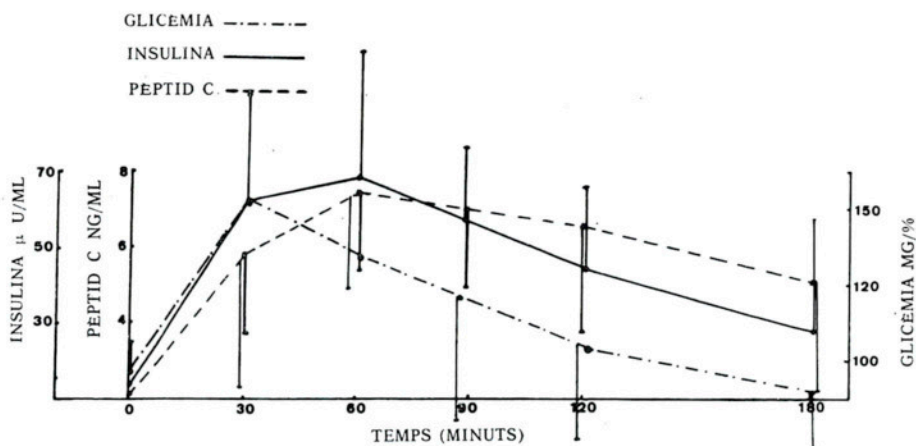


FIG. 3.— Representació gràfica dels valors de glicèmia, insulina i pèptid C (M ± SD).

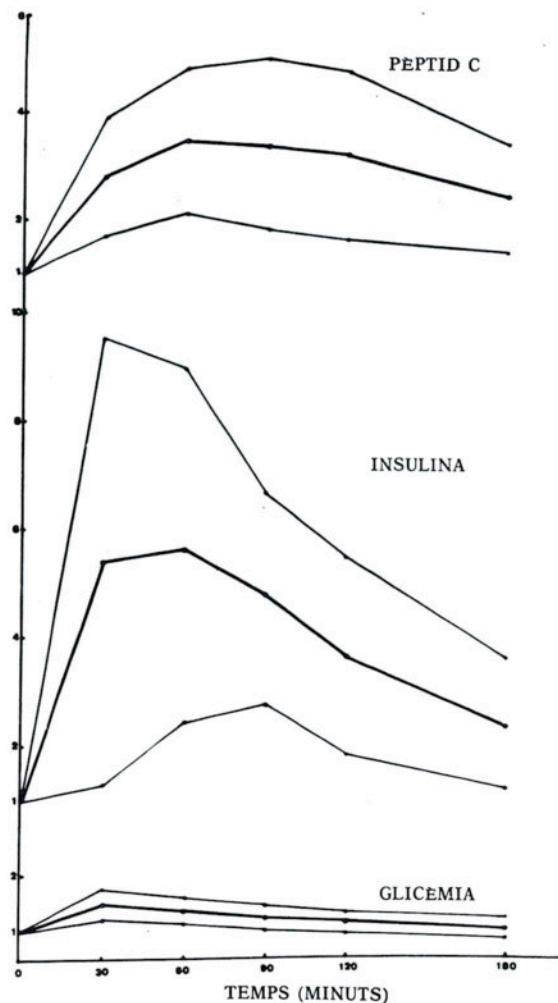


FIG. 4.— Id. fig. anterior, però expressat en increments sobre el valor basal.

Així mateix, i ja en el punt basal, la concentració d'ambdues substàncies no són equivalents mol a mol, sinó que el pèptid C hi és en concentracions gairebé deu vegades superiors a les de la insulina.

La relació tendeix a fer-se més tancada en el punt de la màxima secreció, però sense arribar, almenys a la perifèria, a la relació 1 (fig. 5)². Alguns autors han trobat una relació pròxima a aquesta en estudiar la situació en sang portal¹⁰.

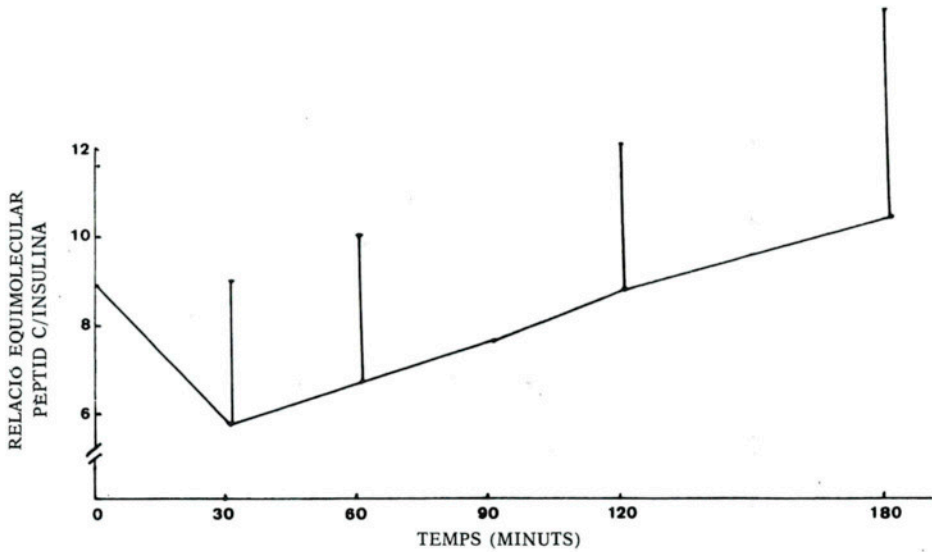


Fig. 5. — Relacions molars peptid C-insulina en sang perifèrica durant la sobrecàrrega oral amb glucosa ($M \pm SD$).

La correlació insulina-peptid C establerta de forma global per a cada un dels punts és, en els nostres casos, de 0.62, tal com es pot veure a la figura 6. Aquesta correlació passa a ser de 0.78 si considerem els valors individuals i en fem la mitjana.

Això és en desacord amb els valors d'altres autors (HORWITZ i col·laboradors¹⁰), els quals troben unes correlacions de 0.86 en una població de tres individus, bé que en aquest cas la glucosa era subministrada per infusió endovenosa en lloc de per via oral.

Totes aquestes discordances creiem que poden ser explicades, en part, per la diferència en la via metabòlica d'aquestes dues substàncies. Sembla que no es pot dubtar que, mentre la insulina és metabolitzada pel fetge fonamentalment, el peptid C conjuntament amb la proinsulina ho són pel ronyó, el qual els extreu en un percentatge d'un 69 %⁹.

Així mateix, existeixen diferències notòries entre les taxes d'aclariment i la mitjana de vida d'aquestes dues substàncies. Així, l'aclariment metabòlic de la insulina, segons KATZ i col·lab.¹³, és de 16.4 ml/min. Això comporta una mitjana de vida per al peptid C d'11.1 min. i de 4.8 min. per a la insulina.

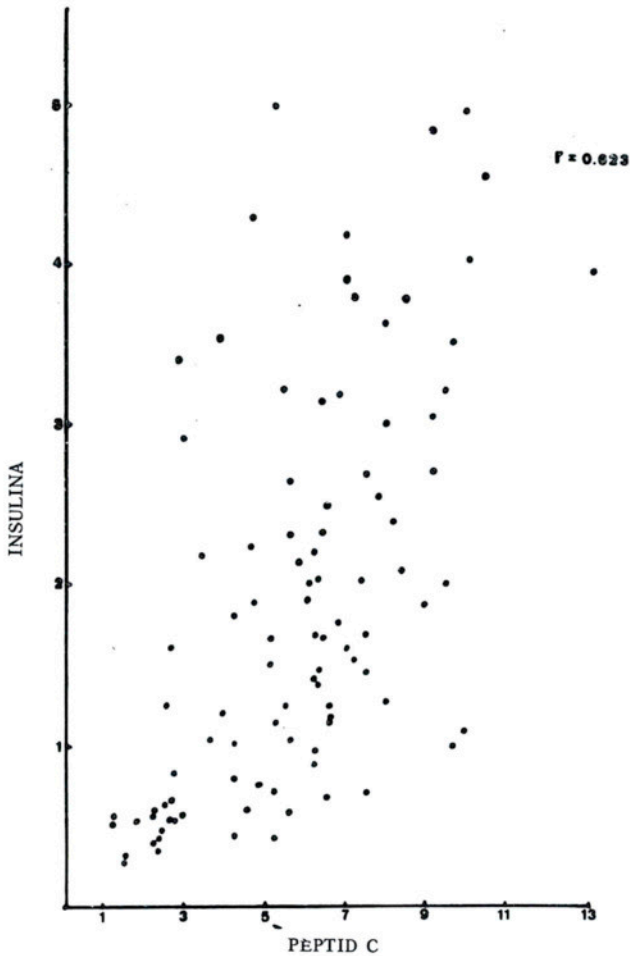


FIG. 6. — Correlació entre les concentracions d'insulina i pèptid C en sang perifèrica després de la sobrecàrrega oral de glucosa.

Tot això ens emmena a la conclusió que el pèptid C és metabolitzat molt més lentament que la insulina, cosa que fa que les concentracions plasmàtiques del primer siguin molt superiors als de la segona i, en tots els casos, les seves relacions molars superin la unitat.

Alguns autors (WADELL, W. R., 1967 i KADEN, M. P., 1973), suggereixen que l'extracció hepàtica de la insulina augmenta quan s'incrementa la seva secreció pancreàtica. Uns altres autors, però (KAPLAN, N., 1959 i SAMOLS, E., 1961) suggereixen el contrari. Aquestes contradiccions feren

pensar que, en determinades situacions, la valoració del peptid C podria proporcionar una visió més clara de la secreció de les cèl·lules beta que no la determinació de la insulina perifèrica.

Els nostres resultats, però, units a la creença acceptada del fet que el peptid C és biològicament inactiu, ens fan pensar que, si bé aquesta substància reflecteix l'activitat secretora pancreàtica, no és un índex exacte de l'acció hormonal, motiu pel qual no pot ser utilitzat com a substitutiu de la valoració d'insulina en circumstàncies normals^{7, 8}.

De tota manera, existeixen dues situacions clíniques en les quals la seva determinació pot ser d'utilitat, ja sigui com a valor diagnòstic o com ajuda en el seguiment terapèutic.

Una d'elles es refereix als diabètics joves o adults insulino-dependents durant «els períodes de remissió» en els quals se suposa que existeix activitat de les cèl·lules beta^{1, 2, 3}. En aquests casos, la presència comprovada d'anticossos circulants que lliguen tant la insulina com la proinsulina, invaliden la determinació per RIA de la primera, per la qual cosa el peptid C seria un índex fidel de la secreció endògena de la insulina en no ser lligat pels anticossos esmentats.

La segona es refereix al diagnòstic de l'insulinoma, per al qual existeix una prova bàsica consistent en la «frenació amb insulina»; les dosis creixents d'insulina exògena subministrada produeixen, en individus normals, un descens en la glicèmia simultani a un descens del peptid C.

En cas que no s'observi aquesta disminució com a resultat de l'acció inhibidora de la insulina, es posarà de manifest la presència d'un tumor pancreàtic de secreció autònoma.

BIBLIOGRAFIA

1. BLOCK, M. B., MAKO, M. E. i RUBINSTEIN, A. H. — *Diabetic ketoacidosis. Evidence for C-Peptide and Proinsulin secretion following recovery.* «J. Clin. Endocrinol. Metab.», 35: 402 (1972).
2. BLOCK, M. B., MAKO, M. E., STEINER, D. F. i RUBINSTEIN, A. H. — *Circulating C-Peptide Immunoreactivity. Studies in normals and diabetic patients.* «Diabetes», 21: 1013-26 (october 1972).
3. BLOCK, M. B., ROSENFELD, R. L., MAKO, M. E., STEINER, D. F. i RUBINSTEIN, A. H. — *Sequential changes in beta-cell function in insulin-treated diabetic patients assessed by C-Peptide immunoreactivity.* «The N. Engl. J. Med.», 288: 1144-1148 (1973).
4. BROWN, M. E. — *Méthode à la néocuproïna. Adaptation a l'Autoanalyser Technicon.* «Diabetes», 10: 60-62, 1961.
5. BITNER, D. i CLEARY, M. MC. — *Ultramicrosugar determination using 2-9 dimethyl-1-10 phenantrolina hydrochloride.* «Amer. Jour. Clin. Patho.», 11: 423 (1963).
6. FABER, O. K. i BINDER, C. — *B-cell function and blood glucose control in insulin dependent diabetics within the first month of insulin treatment.* «Diabetologia», 13: 263-268 (1977).

7. HEDING, L. G. i RASMUSSEN, S. M. — *Human C-Peptide in normal and diabetic subjects*. «Diabetologia», 11: 201 (1975).
8. HORWITZ, D. L., STARR, J. I., RUBINSTEIN, A. H. i STEINER, D. F. — *Serum connecting peptide-an indicator of beta cell secretory function*. «Diabetes», 22: 298 (suppl 1) (1973).
9. HORWITZ, D. L. i RUBINSTEIN, A. H. — *Heterogeneity of circulating insulin and proinsulin in man*. In *Heterogeneity of Polypeptide Hormones*. Ed. by D. Rabinowitz and J. Roth. «Academic Press» (1974).
10. HORWITZ, D. L., STARR, J. I., MAKO, M. E., BLACKARD, W. G. i RUBINSTEIN, A. H. — *Proinsulin, Insulin, and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood*. «The J. Clin. Invest.» vol. 55, 1278-1283 (June 1975).
11. JOHNSTON, D. G., ALBERTI, K. G. M. M., FABER, O. K. i BINDER, C. — *Hyperinsulinism of hepatic cirrhosis: diminished degradation or hypersecretion?* «The Lancet», 1: 10-12 (January 1977).
12. KANEKO, T., OKA, H., MUNEMURA, M., ODA, T., YAMASHITA, K., SUZUKY, S., YANAIHARA, N., HASHIMOTO, T. i YANAIHARA, CH. — *Radioimmunoassay of human Proinsulin, C-Peptide using Synthetic human connecting peptide*. «Endocrinol.» Japon, 21 (2): 141-145 (1974).
13. KATZ, A. I. i RUBINSTEIN, A. H. — *Metabolism of Proinsulin, Insulin and C-Peptide in the rat*. «The Journal of Clinical Invest.», vol. 52, 1113-1121 (1973).
14. LUDVIGSSON, J. SÄFWENBERG, J. i HEDING, L. G. — *HLA-Types, C-Peptide and Insulin antibodies in juvenile diabetes*. «Diabetologia», 13: 13-17 (1977).
15. MELANI, F., RUBINSTEIN, A. H., OYER, P. E. i STEINER, D. F. — *Identification of Proinsulin and C-Peptide in human serum by a specific immunoassay*. «Proc. Natl. Acad. Sci.», U.S.A. Vol. 67 No. 1, 148-155 (1970).
16. MORGAN, C. R. i LAZAROW, A. — *Immunoassay of Insulin: two antibody system*. «Diabetes», 26: 661 (Suppl. 2) (1972).
17. RUBINSTEIN, A. H., CLARCK, J. L., MELANI, F. i STEINER, D. F. — *Secretion of Proinsulin, C-Peptide by pancreatic cells and its circulation in blood*. «Nature», 224: 697-699 (1969).
18. RUBINSTEIN, A. H., BLOCK, M. B., STARR, J. MELANI, F. i STEINER, D. F. — *Proinsulin and C-Peptide in blood*. «Diabetes», 26: 661 (Suppl. 2) (1972).
19. RUBINSTEIN, A. H., POTTENGER, L. A., MAKO, M. E., GETZ, J. S. i STEINER, D. F. — *The metabolism of Proinsulin and Insulin by the liver*. «J. Clin. Invest.», 51: 912 (1972).
20. SANDO, H., BORG, J. i STEINER, D. F. — *Studies on the secretion of newly synthesized Proinsulin and Insulin from isolated rat islets of Langerhans*. «J. Clin. Invest.», 51: 1476 (1972).
21. STARR, J. I. i RUBINSTEIN, A. H. — *Insulin, Proinsulin and C-Peptide*. In *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. Ed. by Bernard M. Jaffe and Harold R. Behrman. «Academic Press» (1974).