

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

**LA RUTA BIOSINTETICA DEL HEMO
EN DIABETES MELLITUS HUMANA Y
EXPERIMENTAL**

DIRECTORES

D.R.ENRIQUEZ DE SALAMANCA LORENA

D.J.L.REBOLLAR MESA

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Blanca Fernández-Cuartero Rebollar

Madrid 1994

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. RAFAEL ENRIQUEZ DE SALAMANCA LORENTE CATEDRATICO Y D. JOSE LUIS REBOLLAR MESA PROFESOR TITULAR, AMBOS DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, CERTIFICAN:

La Tesis Doctoral titulada " LA RUTA BIOSINTETICA DEL HEMO EN DIABETES MELLITUS HUMANA Y EXPERIMENTAL " ha sido realizada por Dña. BLANCA FERNANDEZ-CUARTERO REBOLLAR en la Unidad de Investigación sobre Porfirias, Departamento de Medicina, bajo nuestra supervisión y dirección.

Consideramos que dicha Tesis Doctoral es apta para ser presentada y defendida, ya que reúne los criterios de originalidad y calidad exigibles para optar al grado de Doctor.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

DR. R. ENRIQUEZ DE SALAMANCA
DR. J.L. REBOLLAR MESA

Fdo.: _____
(fecha y firma)

Fdo.: - - - - -
(fecha y firma)

D.N.I.:

D.N.I.: 1.464.335 ; 3. 253.242

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

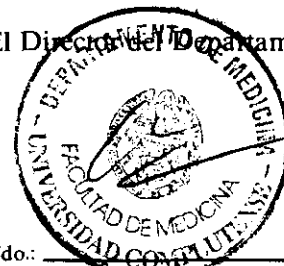
DR. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UCMA.

INFORMA: que una vez examinado el Trabajo presentado por Dña. Blanca Fernández Cuartero Rebollar , titulado: "LA RUTA BIOSINTETICA DEL HEMO EN DIABETES MELLITUS HUMANA Y EXPERIMENTAL", dirigido por los Profesores Dres: Rafael Enríquez de Salamanca y D. JOse Luis Rebollar Mesa, este Departamento de Medicina da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

23-3-1994

El Director del Departamento



Fdo.: _____
(fecha y firma)
10-6-1994

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a los profesores D. Rafael Enriquez de Salamanca y a D. Jose Luis Rebollar Mesa su orientación y colaboración en la realización de esta tesis doctoral, así como por sus profundos conocimientos científicos y su gran paciencia.

A todos los miembros de la Unidad de Porfirias por su gran ayuda, interés y aliento.

Al personal del laboratorio de Obesidad y Diabetes Mellitus y a la unidad de Diabetes Mellitus por su colaboración desinteresada.

A D. Jose Ibarra Rueda por su colaboración, interés y paciencia sin las cuales no se podría haber realizado esta tesis doctoral.

ABREVIATURAS

AIA	alilisopropilacetamida
ALA	ácido delta-amino-levulínico
ALA-D	delta-amino-levulínico-deshidratasa
ALA-S	delta-amino-levulínico-sintetasa
COPRO	coproporfirina
COPROgenio	coproporfirinógeno
COPRO-OX	coproporfirinógeno oxidasa
DM	diabetes mellitus
DMID	diabetes mellitus insulino dependiente
DMNID	diabetes mellitus no insulino dependiente
HbA1	hemoglobina glicosilada
PBG	porfobilinógeno
PBG-asa	porfobilinogenasa
PBG-D	porfobilinógeno desaminasa
PCT	porfiria cutánea tarda
PIA	porfiria aguda intermitente
PROTOgenio	protoporfirinógeno
PROTO-OX	protoporfirinógeno oxidasa
STZ	estreptozotocina
URO-CoS	uroporfirinógeno cosintetasa
URO-D	uroporfirinógeno descarboxilasa
UROgenio	uroporfirinógeno
URO-S	uroporfirinógeno I sintetasa

INDICE

INTRODUCCION	1
I. IMPORTANCIA DE LAS PORFIRINAS EN LOS SERES VIVOS	2
II. BIOSINTESIS DEL HEMO	2
III. CATABOLISMO DEL HEMO	13
IV. DESTINO DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO	15
V. PORFIRIAS Y PORFIRINOPATIAS	17
VI. CONCEPTO Y CLASIFICACION DE DIABETES MELLITUS (DM)	26
VII. CRITERIOS DIAGNOSTICOS Y PARAMETROS BIOQUIMICOS EN DM	29
VIII. DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDIENTE (DMID)	35
IX. DIABETES MELLITUS NO-INSULINO-DEPENDIENTE (DMNID)	38
X. CRITERIOS DE INCLUSION EN DMID Y DMNID	41
XI. DM EXPERIMENTAL	43
XII. ALTERACIONES METABOLICAS EN DM	43
XIII. PORFIRIAS Y DM	46
OBJETIVOS	50
MATERIAL Y METODOS	53
I. PACIENTES	54

II.	ANIMALES DE EXPERIMENTACION	59
III.	DETERMINACIONES ENZIMATICAS	60
IV.	DETERMINACION DE PORFIRINAS EN PLASMA Y HEMATIES	65
V.	DETERMINACION DE PORFIRINAS EN ORINA	67
VI.	DETERMINACION DE PORFIRINAS EN TEJIDO HEPATICO	67
VII.	DETERMINACION DE PROTEINAS EN TEJIDO HEPATICO	68
VIII.	METODOS ESTADISTICOS	69

RESULTADOS	72
-------------------	----

COMENTARIOS	126
--------------------	-----

ALTERACIONES DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO EN DM	127
---	-----

ALTERACIONES DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO EN GRUPOS TERAPEUTICOS DE DMNID	137
---	-----

RELACION ENTRE EL CONTROL DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO EN DM Y LAS ENZIMAS DE LA RUTA HEMO	139
--	-----

INFLUENCIA DE LA EDAD, TIEMPO DE EVOLUCION, SEXO Y SUPERFICIE CORPORAL EN LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO Y EN EL METABOLISMO HIDROCARBONADO DE PACIENTES CON DM	146
--	-----

INFLUENCIA DE LA SIDEREMIA Y FERRITINEMIA EN LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO EN LA DMNID	149
--	-----

VALORES DEL ZINC SERICO EN LA DMNID Y SU POSIBLE INFLUENCIA EN LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO	155
--	-----

ALTERACIONES DE LAS PORFIRINAS PLASMATICAS, URINARIAS Y ERITROCITARIAS EN DM	159
--	-----

INFLUENCIA DE LA EDAD, TIEMPO DE EVOLUCION, SUPERFICIE CORPORAL Y SEXO EN LA CONCENTRACION DE PORFIRINAS PLASMATICAS, URINARIAS Y ERITROCITARIAS EN DM	163
--	-----

INFLUENCIA DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO EN LA CONCENTRACION	
---	--

DE PORFIRINAS PLASMATICAS, URINARIAS Y ERITROCITARIAS EN DM	168
INFLUENCIA DEL ZINC, HIERRO Y FERRITINA SERICOS EN LA CONCENTRACION DE PORFIRINAS PLASMATICAS, URINARIAS Y ERITROCITARIAS EN DM	170
DISCUSION	172
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFIA	184

INTRODUCCION

I. IMPORTANCIA DE LAS PORFIRINAS EN LOS SERES VIVOS.-

Las porfirinas son moléculas orgánicas cíclicas, constituidas por cuatro anillos pirrólicos unidas por puentes metileno.

Actúan como grupo prostético de gran variedad de hemoproteínas: hemoglobina, mioglobina, citocromos, peroxidasas, catalasas, etc; de esta forma intervienen en procesos fundamentales para los seres vivos.

En algunas bacterias, la ruta metabólica de las porfirinas conduce a la síntesis del anillo corrínico y vitamina B12.

La ruta de las porfirinas, en los organismos fotosintéticos conduce a la síntesis de clorofila y bacterioclorofila.

El grupo prostético hemo es un quelato complejo de protoporfirina IX con hierro ferroso. Cuando el complejo se forma con hierro férrico, se denomina hemina o hematina.

II. BIOSÍNTESIS DEL HEMO.-

La biosíntesis del hemo se realiza a partir de precursores muy simples, con una serie de reacciones catabolizadas por enzimas.

Las primeras reacciones para la formación del hemo fueron establecidas por Shemin (1), Rimington (2), Neuberger (3) y Granick (4) como resultado de sus estudios con compuestos radiactivos.(Fig 1)

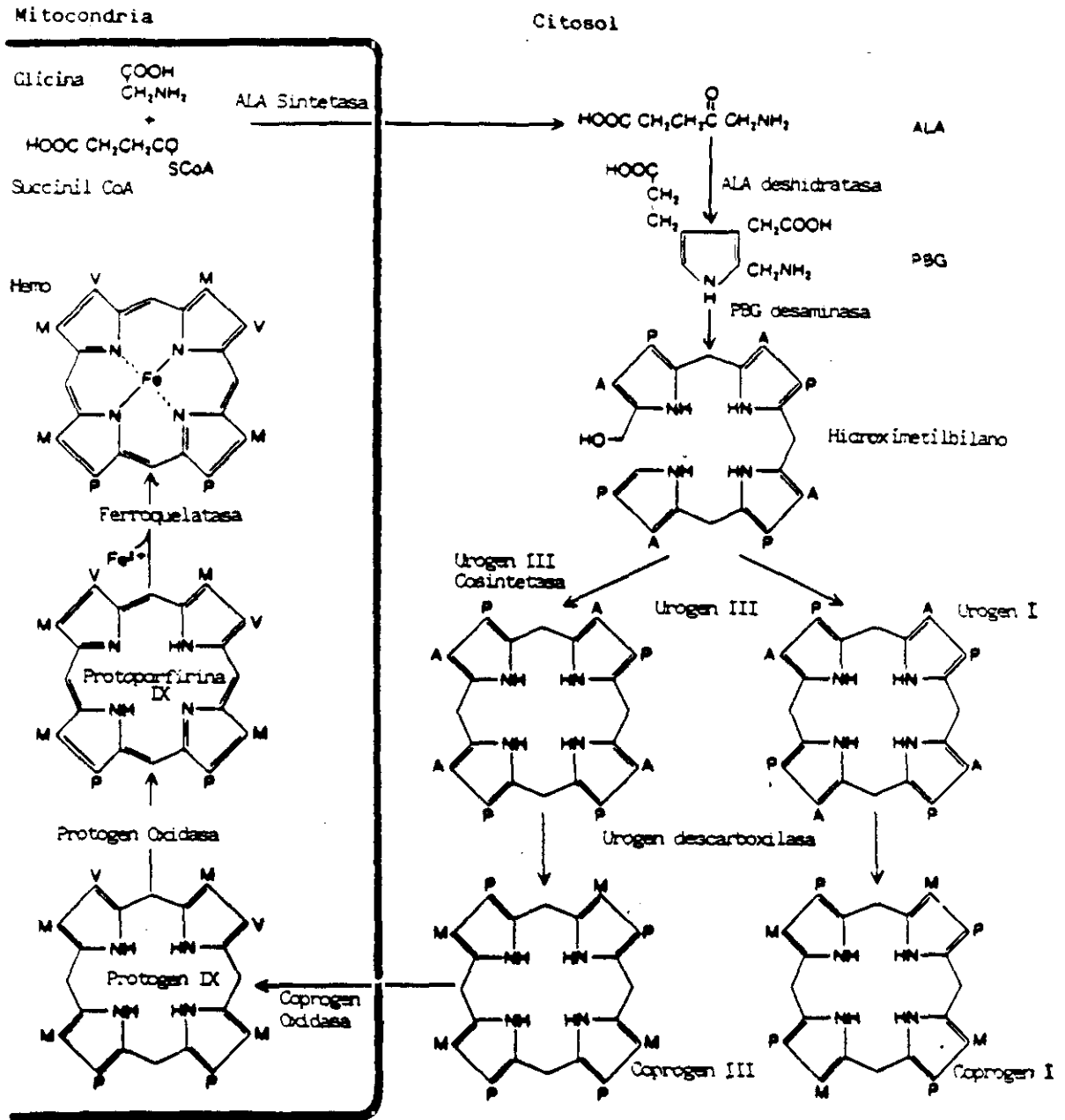


Figura 1. Biosíntesis del hemo. Distribución subcelular de enzimas e intermediarios. A = $-\text{CH}_2\text{COOH}$; M = $-\text{CH}_3$; P = $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$; V = $-\text{CH}=\text{CH}_2$.

II. 1. FORMACION DEL ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO (ALA).-

El ALA se forma a partir del aminoácido glicina o glicocola y succinil-coenzima-A (CoA), procedente del ciclo de Krebs.

Shemin y Rittenberg (5) demostraron en 1945, que la glicocola era precursor del hemo, marcándola primero con ^{15}N y después con ^{14}C . En el laboratorio de Shemin (6,7), mediante el uso de ^{14}C , demostraron el papel de la succinil CoA.

La síntesis de ALA está catalizada por la enzima delta-amino-levulínico-sintetasa (ALA-S). Esta enzima mitocondrial, que presenta un grupo sulfhidrilo en su sitio activo, necesita fosfato de piridoxal como cofactor (8,9) y es muy específica para su substrato, succinil CoA.

Se postula que el mecanismo de acción del ALA-S consiste en la formación de una base de Schiff entre la glicocola y la enzima unida al fosfato de piridoxal. Al condensarse la base de Schiff con succinil Coa, se forma un compuesto inestable, ácido alfa-amino- β -cetoadípico, se decarboxila y se obtiene ALA. (10) **(Fig 2)**

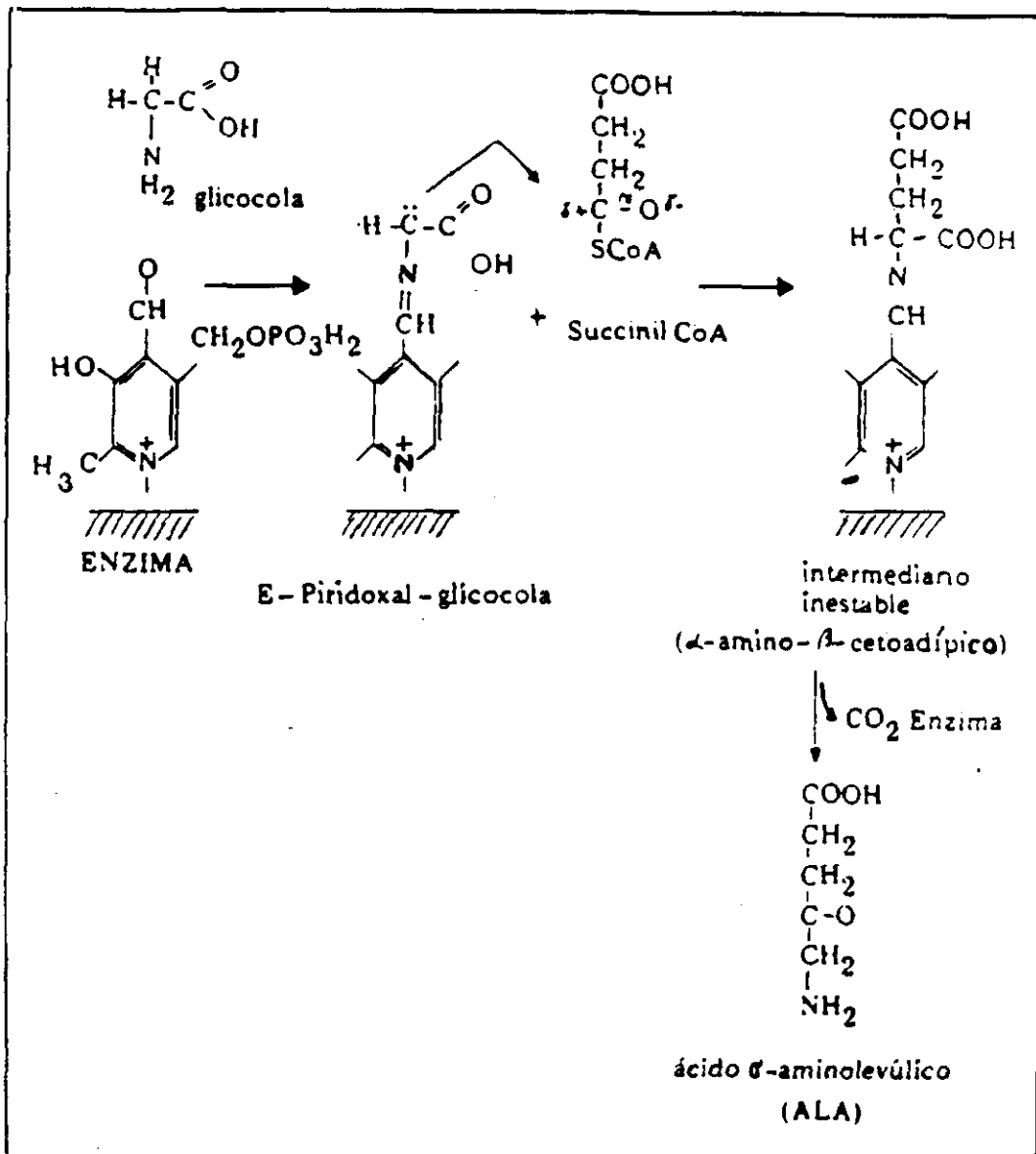


Figura 2. Biosíntesis del ALA (15)

El ALA-S es una enzima inestable, una vez extraída de los tejidos, tiene una vida media de 60 minutos. Es limitante de la síntesis de hemo.

Se han definido dos isoenzimas: ALA-S común o no eritroide, el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 3 y ALA-S eritroide, el gen que la codifica se sitúa en el cromosoma X (11, 12, 13, 14)

II. 2. FORMACION DEL PORFOBILINOGENO (PBG).-

El PBG se obtiene por la condensación de dos moléculas de ALA con pérdida de dos moléculas de agua, reacción catabolizada por la enzima delta-amino-levulínico-deshidratasa (ALA-D).

El ALA-D es una enzima citoplásmica, por tanto el ALA una vez formado en la mitocondria, difunde al citoplasma. En el centro activo de la enzima se encuentran grupos sulfhidrilos, un átomo de Zn por subunidad enzimática, 1 ó 2 residuos de lisina, 1 residuo de histidina y restos de aminoácidos hidrofóbicos. (16,17)

El ALA-D es inhibida por concentraciones muy bajas de los bloqueantes de los grupos sulfhidrilos, como metales pesados (plomo, mercurio, cadmio) y otros reactivos como p-cloro-mercuri-benzoato. Es activada por la presencia de ciertos cationes como zinc, cobre y aluminio, que probablemente protegen los grupos sulfhidrilos, imprescindibles para la actividad enzimática.

Es una enzima termoestable. El gen que codifica la formación de ALA-D, se localiza en el cromosoma 9q34 (18,19); existen como dos isoenzimas ALA-D 1 y 2.(19)

II. 3. SINTESIS DE LOS UROPORFIRINOGENOS I Y III (UROgenos).-

Esta etapa es catalizada por un sistema enzimático denominado Porfobilinogenasa (PBGasa), término propuesto por Lockwood y Benson.(20)

La PBGasa es un complejo proteico formado por dos enzimas, Uroporfirinógeno I Sintetasa (URO-S) o Porfobilinógeno Desaminasa (PBG-D) o hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S) y la uroporfirinógeno III sintetasa o Cosintetasa o Isomerasa (URO-CoS).

La PBG-D o URO-S, enzima termoestable, cataliza la condensación secuencial de cuatro moléculas de PBG, para formar un tetrapirrol lineal, denominado Hidroximetilbilano.

En ausencia de URO-CoS, enzima termolábil, el hidroximetilbilano se libera de la enzima URO-S y se cicla espontáneamente para convertirse en uroporfirinógeno I. Este isómero carece de interés biológico.

En presencia de URO-CoS se reorganiza el anillo D y se cicla el hidroximetilbilano para obtener uroporfirinógeno III, isómero necesario para la síntesis de hemo.(21, 22)(**Fig 3**)

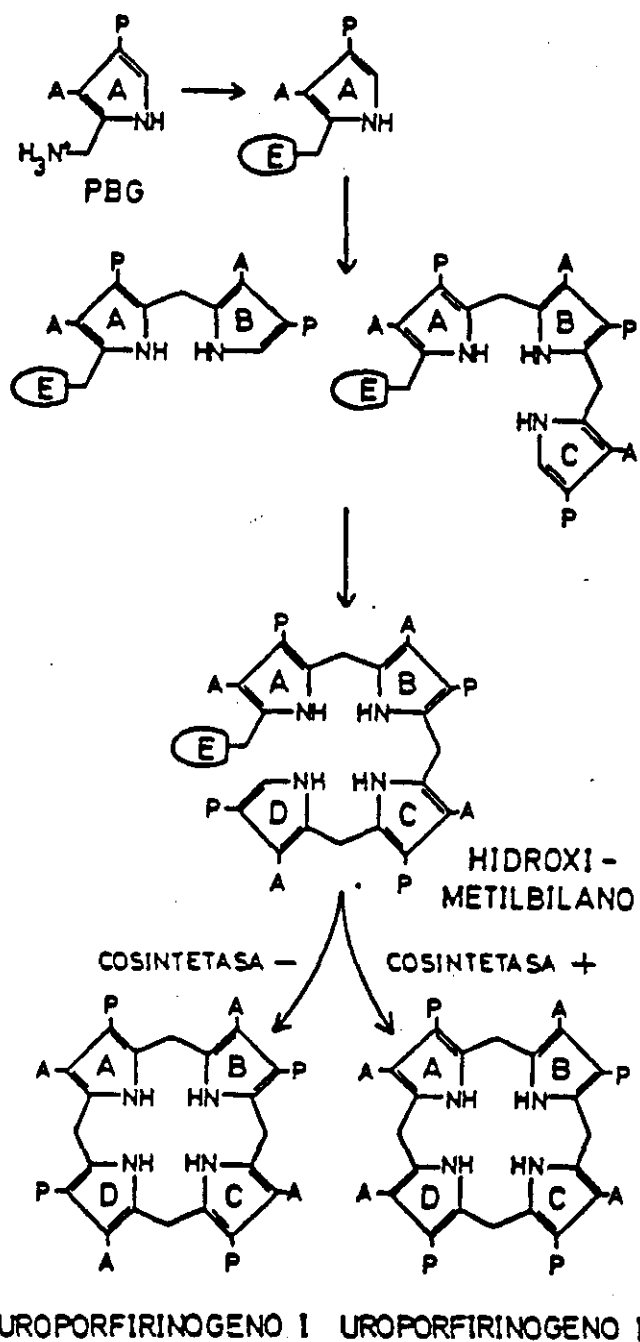


Figura 3. Formación de los uroporfirinógenos (UROgenos) a partir del PBG. PBG-E=PBG-desaminasa; A=ácido acético; P=ácido propiónico.

En los tejidos se ha observado predominio de actividad de Cosintetasa sobre Desaminasa, lo que favorecería la síntesis de uroporfirinógeno III.

La PBG Desaminasa es una enzima citoplásmica y sulfhídrica (23), está codificada en un gen estructural localizado en el brazo largo del cromosoma 11. (24)

II. 4. FORMACION DE LOS COPROPORFIRINOGENOS I Y III (COPROgenos).-

La enzima uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D) cataliza la descarboxilación de los UROgenos I y III, obteniendo los correspondientes COPROgenos I y III. Es la última enzima citoplásmica de la ruta hemo. Actúa con mayor velocidad sobre el UROgeno III que sobre el UROgeno I, así la velocidad de descarboxilación en los eritrocitos humanos es siete veces superior en la línea fisiológica del isómero III (25).

La descarboxilación del UROgeno III es secuencial, convirtiendo los restos acetato en grupos metilo. El proceso se inicia en el anillo D, continúa en los anillos A, B y C, siguiendo el sentido de las agujas del reloj. Esta secuencia fisiológica fue establecida por Jackson y colaboradores (26) (Fig 4).

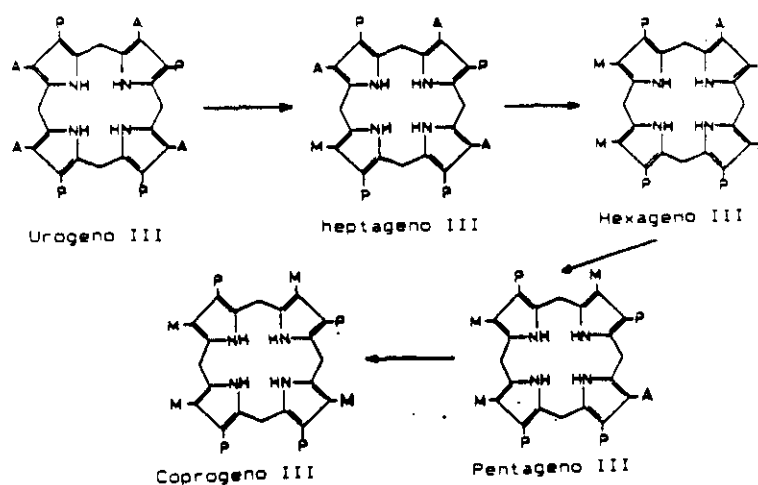


Figura 4. Formación de COPROgeno III a partir de URO geno III.

A = $-\text{CH}_2\text{-COOH}$; P = $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$; M = $-\text{CH}_3$.

La enzima no sigue una ruta específica cuando descarboxila el UROgenio I para obtener COPROgenio I.

La URO-D es una enzima sulfhídrica, termoestable y preferentemente anaeróbica. El oxígeno inhibe su acción por oxidación de su substrato y por acción directa sobre la enzima.

El gen que codifica la síntesis de la URO-D humana se localiza en el cromosoma 1 (27).

II. 5. FORMACION DE PROTOPORFIRINOGENO IX (PROTOgenio IX).-

Una vez formado, el COPROgenioIII pasa del citoplasma a la mitocondria. Allí sufre una descarboxilación oxidativa de los restos propiónicos de los anillos A y B que se convierten en dos grupos vinilos, con eliminación de dos moléculas de CO₂ y dos protones y se obtiene protoporfirinógeno IX. (28, 29, 30 31)(Fig 5)

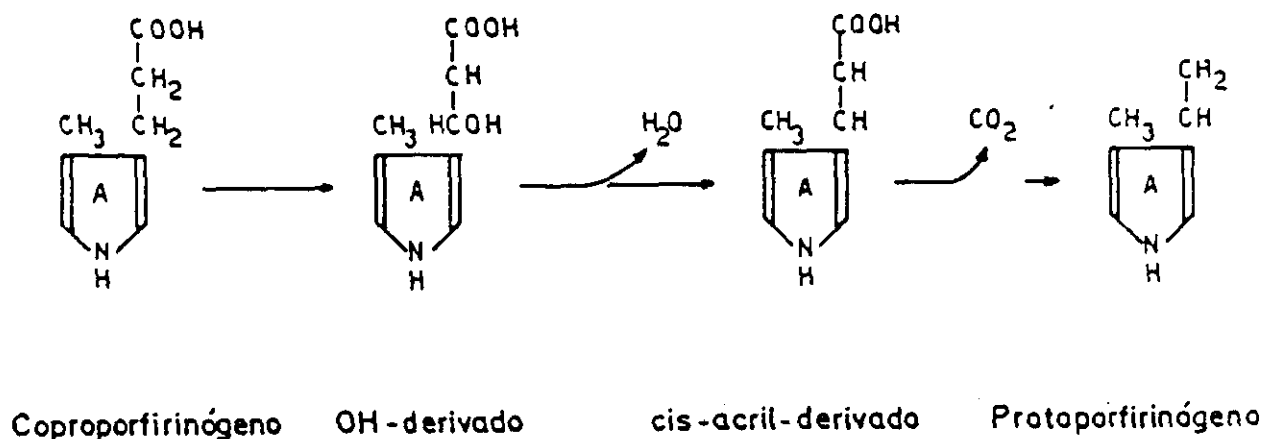


Figura 5. Descarboxilación oxidativa del Coprogeno III a protogeno IX (15)

La enzima responsable es la coproporfirinógeno-oxidasa (COPRO-OX) o coproporfirinógeno descarboxilasa o coproporfirinogenasa. Está situada en el espacio intermembranoso de la mitocondria (32). Requiere la presencia de oxígeno y sólo actúa sobre el isómero III.

El gen que codifica la COPRO-OX humana se encuentra en el cromosoma 9 (33).

II. 6. FORMACION DE LA PROTOPORFIRINA IX (PROTO IX).-

El protoporfirinógeno IX es oxidado, con pérdida de seis átomos de hidrógeno, y convertido en protoporfirina IX (Fig 6).

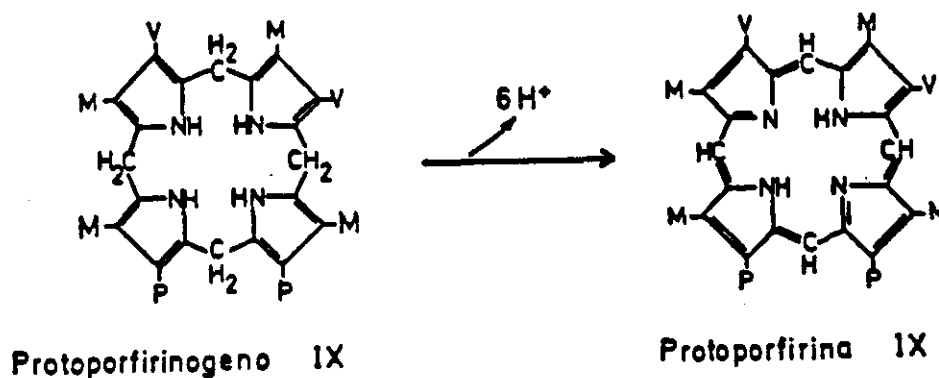


Figura 6. Formación de la Protoporfirina (PROTO) a partir del Protoporfirinógeno (PROTOgeno).

La reacción es catalizada por una enzima mitocondrial, denominada protoporfirinógeno oxidasa (PROTO-OX). Fue aislada por primera vez por Poulson y colaboradores (34, 35).

La PROTO-OX es una enzima sulfhídrica, requiere oxígeno, no la afectan los agentes quelantes y se localiza fuertemente asociada a la membrana interna de la mitocondria (36).

No se conoce bien el mecanismo de acción de la enzima, aunque se ha postulado que en su sitio activo hay residuos sulfhídricos. El substrato, protoporfirinógeno, se uniría a estos residuos, y su oxidación incluiría la pérdida de los átomos de hidrógeno de uno de los lados del anillo porfirínico.(37)

II. 7. FORMACION DEL HEMO.-

El último paso en la síntesis del hemo es la inserción del ion ferroso en la protoporfirina IX (Fig 7).

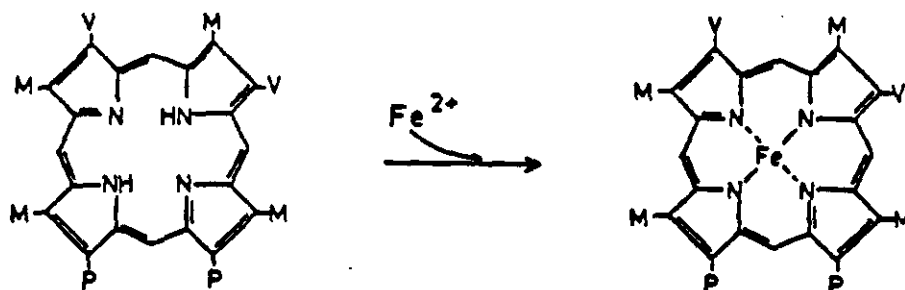


Figura 7. Formación del hemo a partir de Protoporfirina (PROTO)

Esta reacción es catalizada por la enzima ferroquelatasa o hemo-sintetasa, fuertemente asociada a la membrana interna mitocondrial (38). Es específica para el hierro y puede utilizar protoporfirina IX u otra porfirina, pero no sus porfirinógenos, como sustrato.

La ferroquelatasa es una enzima sulfhídrica. La presencia de glutatión reducido activa la enzima, el oxígeno y ciertos metales divalentes (magnesio, plomo) inhiben su acción. El fosfato de piridoxal es necesario para la actuación de la enzima y está fuertemente unido a ella (39).

Es una enzima reguladora de la síntesis del hemo, al igual que la ALA-S, ya que es inhibida por su sustrato y por el hemo.

III. CATABOLISMO DEL HEMO.-

Las hemoproteínas son captadas por las células del sistema retículo-endotelial de todo el organismo, en donde enzimas proteolíticas desprenden el grupo hemo.

El hemo sufre una oxidación, se abre su anillo y se transforma en una cadena recta de cuatro núcleos pirrólicos, denominada biliverdina, que es el primer pigmento biliar sintetizado.

La oxidación es catalizada por la Hemo-Oxigenasa (Hemo-ox), enzima microsómica que requiere oxígeno y, como cofactor, NADPH. Para obtener NADPH se necesita la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa que, junto a la Hemo-ox, constituye el sistema Hemo-oxigenasa microsomal (40).

La biliverdina es reducida a bilirrubina IX-alfa por la biliverdina reductasa. En el plasma, la bilirrubina se transporta unida a albúmina; la máxima capacidad de unión es de dos moles de bilirrubina por cada mol de albúmina.

El hepatocito capta la bilirrubina del plasma, la libera de la albúmina y la une a proteínas citoplásmicas, ligandinas Y y Z.

En el retículo endoplásmico del hepatocito, se conjuga la bilirrubina con ácido glucurónico por la glucuronil-transferasa; el complejo es soluble en agua y puede ser excretado en la bilis. (41)(Fig 8)

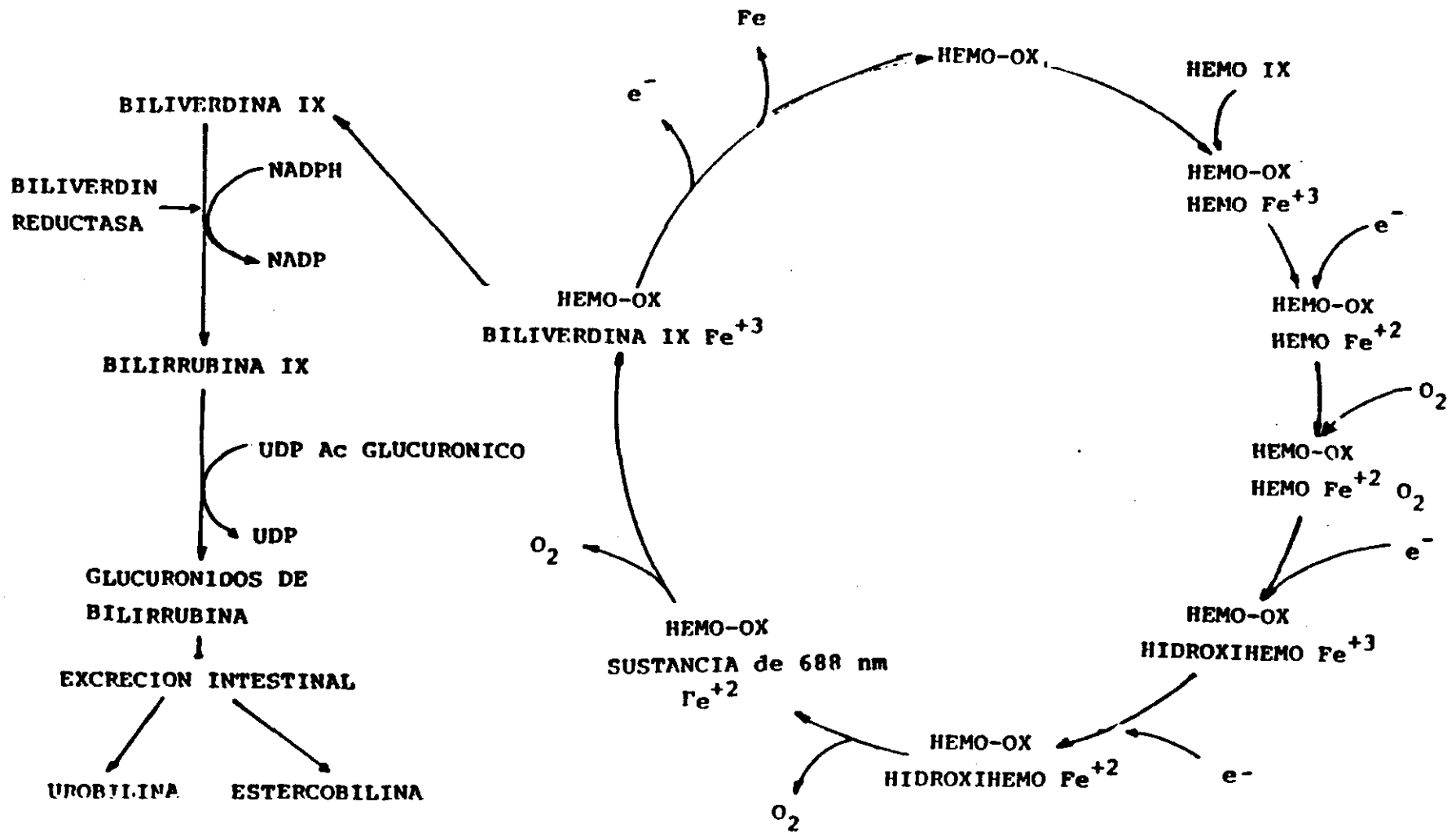


Figura 8. Representación esquemática de la ruta de degradación del Hemo

IV. DESTINO DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO.-

El grupo prostético hemo es necesario en todas las células corporales y cada tejido regula su biosíntesis. Este es el motivo por el que se han detectado grandes diferencias en la concentración tisular de hemoproteínas.

De todos los tejidos, es en la médula ósea y en el hígado donde el control de la biosíntesis del hemo es mas importante. En el adulto, el 85% del hemo es sintetizado en las células eritroides de la médula ósea y la mayor parte del resto se sintetiza en el hígado.(42)

En la médula ósea, el hemo se emplea fundamentalmente para la síntesis de hemoglobina. En el hígado se sintetizan hemoproteínas de vida relativamente breve, en especial los citocromos microsómicos P-450.

La síntesis del citocromo P-450 puede ser inducida por muchos fármacos liposolubles, esteroides y otras sustancias químicas que son substrato de las hemoproteínas. En el hígado de rata, estos citocromos representan el 60 a 70% del total del hemo hepático.(43)

IV. 1. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO HEPATICO.-

El ALA-S es la enzima limitante en la biosíntesis del hemo hepático. Los dos mecanismos de control son:

1.- Rápido, en el que se modifica la actividad enzimática. Se denomina control por retroinhibición o "feed-back", presente en muchos procesos enzimáticos. Si la concentración de hemo supera los niveles normales, se inhibe la enzima ALA-S (44, 45).

El tratamiento del ataque agudo en las porfirias hepáticas (porfiria aguda intermitente, coproporfiria hereditaria y porfiria variegata) reside en la administración intravenosa de hematina (46). Con ésto se pretende incrementar la concentración hepática de hemo libre regulador, con la consiguiente inhibición de la hiperactividad de la enzima ALA-S.

2.- Lento, por cambios en la cantidad de la enzima. Según la hipótesis de Jacob y Monod, en los tejidos la síntesis del hemo se encuentra reprimida (Fig 9).

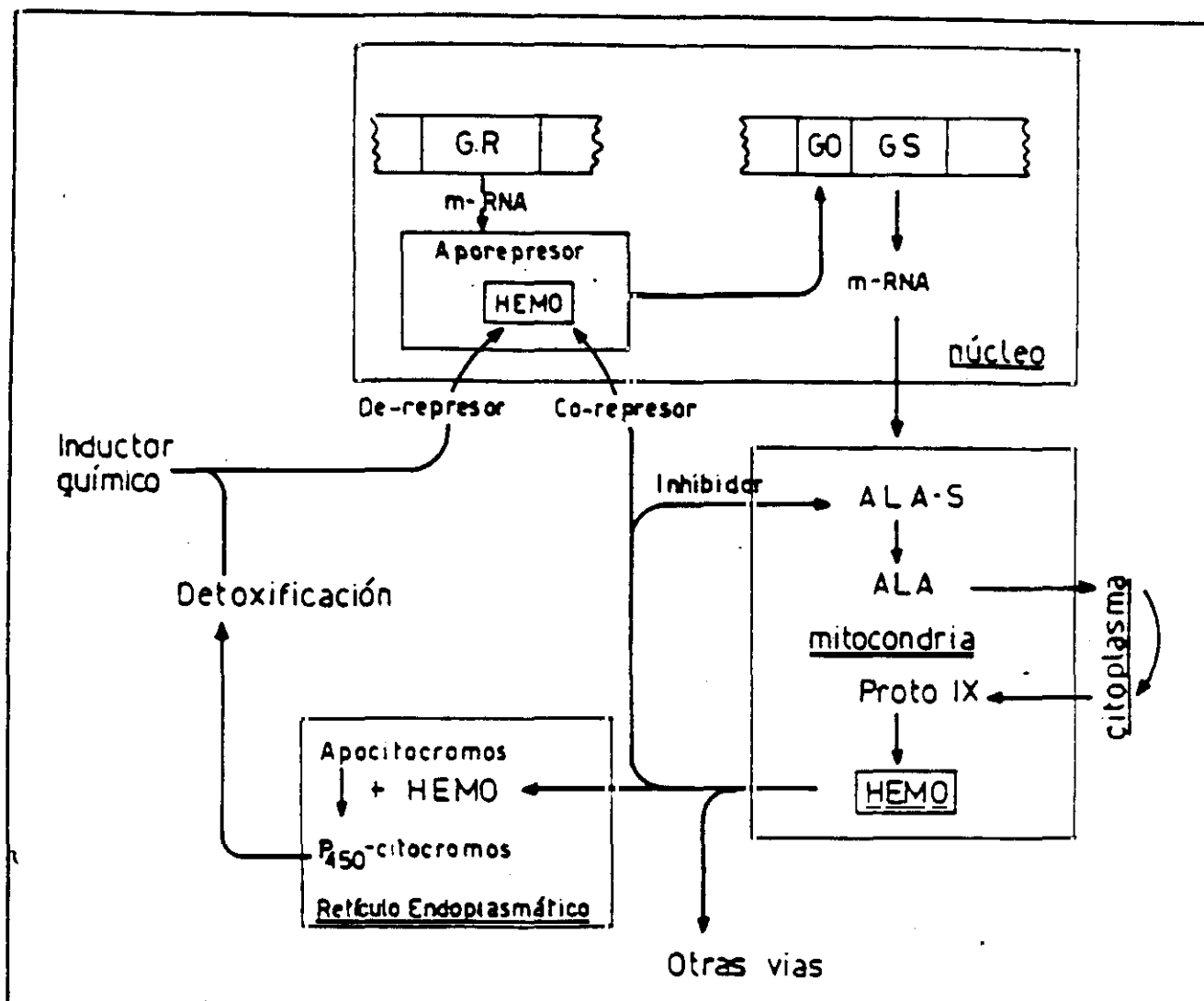


Figura 9. Mecanismos generales de la regulación de la biosíntesis del hemo (15).

El gen regulador (GR) sintetiza una proteína (apo-receptor) que cuando se combina con co-receptor que en este caso es el hemo, se forma un represor activo. Este represor activo impide la síntesis de RNA mensajero por el gen estructural (GS) y, por tanto, la síntesis de ALA-S.

IV. 2. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN LA MEDULA OSEA.-

Por semejanza con el tejido hepático, en la médula ósea se ha propuesto a la enzima ALA-S como limitante en la síntesis del hemo. Sin embargo, estudios de la regulación del hemo en reticulocitos (47) y en células eritroides inmaduras de conejo (48), no confirman esta teoría; en estos trabajos el paso limitante en la biosíntesis del hemo es la incorporación del hierro cuyo aporte está controlado por hemo (14, 49). En la actualidad se considera al hemo como el compuesto básico en el control de la ruta biosintética del hemo en médula ósea; diferentes autores (11, 50) han observado en células eritroides humanas inmaduras que el hemo es capaz de inhibir la actividad de la enzima ALA-S e incluso puede actuar como fuente de hierro.

V. PORFIRIAS Y PORFIRINOPATIAS.-

Se denominan porfirias al grupo de enfermedades metabólicas causadas por un error congénito en el metabolismo porfirínico, con hipoactividad de una de las enzimas que intervienen en la ruta biosintética del hemo.

Las porfirinopatias son alteraciones en el metabolismo de las porfirinas secundarias a:

- * Enfermedades que afectan a la médula ósea o al hígado, donde se sintetiza la mayor parte del hemo.
- * Afectación de la vía biliar o del riñón, órganos encargados de la excreción de porfirinas y precursores.
- * La administración de tóxicos que alteren la ruta hemo como metales pesados, hidrocarburos halogenados, fármacos ..etc.(**Tabla 1**)

TABLA 1

Porfirinopatías Secundarias

1. ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS:
 - ANEMIA FERROPENICA
 - SIDEROBLASTICA
 - HEMOLITICA
 - PERNICIOSA
 - ERITROPOYESIS INEFICAZ
 - TALASEMIA
 - LEUCEMIAS Y LINFOMAS

2. ENFERMEDADES HEPATOBILIARES:
 - CIRROSIS HEPATICA
 - HEPATITIS CRONICA ACTIVA
 - HEPATITIS TOXICA E INFECCIOSA
 - ESTEATOSIS HEPATICA
 - HEPATOPATIA ETILICA
 - COLESTASIS Y COLANGITIS
 - CIRROSIS BILIAR PRIMARIA
 - HEMOCROMATOSIS
 - TUMORES HEPATICOS
 - ICTERICIAS CONGENITAS

3. INTOXICACIONES:
 - ETILISMO CRONICO Y AGUDO
 - TOXICOS AMBIENTALES:Hexaclorobenceno
 - Bifenilos polihalogenados
 - Dioxina
 - Cloruro de vinilo
 - Cloroformo
 - Benceno
 - METALES PESADOS:Plomo
 - Mercurio
 - Arsénico
 - DROGAS:Analgésicos
 - Sedantes:Barbitúricos
 - Hidrato de cloral
 - Meprobamato
 - Paraaldehído
 - Morfina

4. ENFERMEDADES METABOLICAS:DIABETES MELLITUS
 - HEMOCROMATOSIS
 - TIROSEMIA HEREDITARIA

5. OTRAS:
 - MONONUCLEOSIS
 - POLIOMIELITIS
 - INFARTO DE MIOCARDIO
 - EMBARAZO
 - AYUNO
 - CANCER DE PANCREAS

TABLA 2

ESQUEMA DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO Y TIPOS DE PORFIRIAS EN RELACIÓN CON LA ENZIMOPATIA		
Ruta metabólica	Enzima	Variedad de porfiria
ALA	ALA-Deshidratasa	Aguda de Doss
PBG		
HMB	UROgeno-Cosintetasa	De Günther
UROgeno I UROgeno III		
HEPTAgenoI HEPTAgeno III		
HEXAgeno I HEXAgeno III	UROgeno- Descarboxilasa	Cutánea tarda
PENTAgeno I PENTAgeno III		
COPROgeno I COPROgeno III	COPROgeno- Oxidasa	Coproporfiria
PROTOgeno		
PROTOporfiria	PROTOgeno- Oxidasa	Variegata
2	HEMO-Sintetasa	Protoporfiria
HEMO		

ALA: ácido aminolevulínico. PBG: porfobilinógeno. HMB: hidroximetilbilano. ...geno: porfirinógeno

V.1. PORFIRIAS.-

Son errores congénitos, con hipoactividad de una de las enzimas de la ruta del hemo.

Encontramos siete variedades de porfirias (**Tabla 2**), aunque son ocho las enzimas que intervienen en la ruta, esto es consecuencia de la función limitante de la enzima ALA-S, que aumenta su síntesis y actividad de forma compensatoria, con el fin de evitar la deficiencia del producto final, el grupo prostético hemo.

Las porfirias por hipoactividad de ALA-D y URO-CoS denominadas, respectivamente, porfiria aguda de Doss y porfiria congénita de Günther, se heredan con carácter autosómico recesivo.

Las otras variedades de porfirias se heredan con carácter autosómico dominante. Se estima que sólo se manifiestan clínicamente en el 20% de los casos (51).

De forma clásica, las porfirias se clasifican en eritropoyéticas y hepáticas, por ser en la médula ósea y en el hígado, donde la síntesis de porfirinas es más activa. Por los síntomas, las porfirias se denominan, agudas y cutáneas. (**Tabla 3**)

TABLA 3

CLASIFICACION DE LAS PORFIRIAS	
Según su origen	según su sintomatología
<u>Eritropoyéticas:</u> - Congénita de Günther - Protoporfiria	Cutánea
<u>Hepáticas:</u> - Cutánea Tarda - Variegata - Coproporfiria	Mixtas
- Aguda de Doss - Intermitente Aguda	Agudas

V. 1. I. PORFIRIA AGUDA DE DOSS.-

Se presenta en individuos homocigotos en la deficiencia de la enzima ALA-D (52); es preciso descartar la existencia de saturnismo y tirosinemia hereditaria, en ambos procesos existe inhibición de la enzima ALA-D.

Es muy rara, los pacientes presentan una actividad enzimática en eritrocitos y médula ósea inferior al 3% del valor normal. Las personas heterocigotas, asintomáticas, presentan una actividad de ALA-D del 22-48% (53).

Las manifestaciones clínicas son similares a las de una porfiria aguda intermitente.

V. 1. II PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE.-

Está causada por hipoactividad de la enzima URO-S, se hereda con carácter autosómico dominante (54).

La mayoría de los individuos afectados permanecen asintomáticos, por ello la prevalencia es difícil de estimar, pero se calculan valores en Europa de 1/20000 habitantes (55). En Suecia es especialmente frecuente, por ello también se la denomina porfiria sueca.

Las crisis porfíricas agudas consisten en manifestaciones abdominales, psíquicas y neurológicas. El dolor abdominal es el síntoma inicial y más frecuente, presente en el 95% de los casos.

V. 1. III. PORFIRIA CONGÉNITA DE GÜNTER.-

Se manifiesta en individuos homocigotos en la deficiencia de la enzima URO-CoS. Es muy poco frecuente, al igual que la porfiria aguda de Doss; sólo se han descrito un centenar de casos.

Los pacientes presentan una marcada fotosensibilidad que provoca mutilaciones de las partes acras.

V. 1. IV. PORFIRIA CUTANEA TARDA (PCT).-

Es la más frecuente de las porfirias, en Madrid se habían diagnosticado 700 casos en el año 1988 (51). La mayoría de los portadores de la alteración metabólica, permanecen asintomáticos, por ello es probable que su prevalencia sea muy elevada.

De Verneuil y cols (55) distinguen dos subtipos de PCT denominados familiar y esporádico.

La PCT familiar se transmite de forma autosómica dominante. En los pacientes y portadores se detecta una hipoactividad de la enzima URO-D, del 50% de su valor normal, en eritrocitos, fibroblastos y tejido hepático.

La PCT esporádica presenta hipoactividad de URO-D limitada al tejido hepático. Su base genética no está excluida, pero podría tratarse de un trastorno adquirido (56).

Los pacientes presentan fotosensibilidad, afectación hepática y depósitos corporales de hierro incrementados.

V. 1. V. COPROPORFIRIA HEREDITARIA.-

Causada por hipoactividad de la enzima COPRO-OX, se hereda con carácter autosómico dominante.

La mayoría de los portadores de la anomalía permanecen asintomáticos, debido a la baja expresividad clínica del gen.

Los pacientes pueden presentar fotosensibilidad y/o crisis agudas como en la porfiria aguda intermitente.

V. 1. VI. PORFIRIA VARIEGATA.-

Se denomina, también porfiria surafricana (57), por la elevada frecuencia entre la población blanca de ese país, 1/200.

Causada por hipoactividad de la PROTOgenio-Ox, se hereda con carácter autosómico dominante.

Es clínicamente mixta, los enfermos pueden presentar fotosensibilidad y/o crisis agudas.

V. 1. VII. PROTOPORFIRIA ERITROPOYETICA.-

Se origina por hipoactividad de la Hemo-Sintetasa o ferroquelatasa. Se hereda con carácter autosómico dominante, de penetrancia variable. Es especialmente frecuente en Gran Bretaña y en Holanda.

Los pacientes sufren una reacción aguda de fotosensibilidad dérmica. También es frecuente que sufran litiasis biliar por formación de cálculos de bilirrubinato cálcico y porfirinosis intrahepática con mínima alteración funcional.

V. 2. PORFIRINOPATIAS.-

Las alteraciones adquiridas en la biosíntesis del hemo o en la excreción de las porfirinas se denominan porfirinopatías secundarias.

V. 2. I. PORFIRINOPATIAS POR ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS.-

Es frecuente encontrar alteraciones del metabolismo porfirínico en los trastornos hemopoyéticos.

En las anemias ferropénicas se encuentra un aumento en la concentración de protoporfirina IX en los eritrocitos. Esto es consecuencia de la falta de hierro para convertir la protoporfirina en hemo (58). Si la biosíntesis de hemo se realizara a su ritmo normal, el acúmulo de protoporfirina sería mayor, por tanto la porfirinosíntesis está enlentecida como mecanismo protector (59). La inhibición de la síntesis de hemo, se acompaña de inhibición de la síntesis de globina, para evitar su acúmulo. (60)

Las anemias sideroblásticas se caracterizan por la presencia de sideroblastos en la médula ósea. La captación de hierro por la médula ósea está aumentado, existe aumento del hierro sérico y de la saturación de la transferrina, pero su incorporación a los eritrocitos está disminuida (61).

En muchos pacientes con anemia sideroblástica congénita se ha demostrado la hipoactividad de la enzima ALA-S (62). Esta alteración responde, en algunos casos, a la administración de fosfato de piridoxal, cofactor de la enzima.

En las anemias hemolíticas se encuentra aumentada la actividad de las enzimas UROgeno CoS, ALA-D y PBG-D. En los eritrocitos encontramos aumento de la concentración de protoporfirina IX.(63)

En pacientes con insuficiencia renal en fase terminal se ha descrito hipoactividad de las enzimas eritrocitarias ALA-D y URO-S (64, 65). La hipoactividad de la enzima ALA-D eritrocitaria parece presentar cierta dependencia del grado de anemia y macrocitosis de los enfermos (66)

V. 2. II. PORFIRINOPATIAS EN ENFERMEDADES HEPATOBILIARES.-

En las enfermedades hepatobiliares que conducen a colestasis se aprecia un incremento en la excreción urinaria de coproporfirina, con predominio del isómero I (67, 68); en la orina de individuos normales encontramos principalmente el isómero III y sólo pequeñas cantidades del I. La coproporfirinuria observada en hepatopatías crónicas está más relacionada con el grado de colestasis que con el tipo histológico de la hepatopatía (69).

En las hiperbilirrubinemias congénitas por aumento de la bilirrubina conjugada (Síndrome de Dubin-Johnson y de Rotor), el porcentaje de coproporfirina I eliminado en orina es mayor que el eliminado en las colestasis adquiridas. La proporción de eliminación del isómero I es mayor en el Síndrome de Dubin Johnson que en el de Rotor.(70)

V. 2. III. PORFIRINOPATIAS POR TOXICOS.-

La intoxicación por plomo (Saturnismo) produce incremento en la eliminación urinaria de ALA y coproporfirina III, así como elevación de protoporfirina eritrocitaria.

Las alteraciones bioquímicas descritas son causadas por la inhibición que el plomo produce en la actividad de las enzimas ALA-D, COPROgenO Ox y ferroquelatasa.(71, 72)

En pacientes con saturnismo, se ha observado incremento de la vida media de ciertos fármacos, cuyo catabolismo se realiza por el sistema enzimático de las oxidasas hepáticas. En este sistema interviene el citocromo P450, el hemo es fundamental para su síntesis. Todo esto hace pensar que el plomo inhibe la síntesis de hemo hepático.(73)

Las sales orgánicas de oro inhiben la actividad de las enzimas ALA-S, ALA-D y ferroquelatasa en eritrocitos, tejido hepático y renal (74).

El consumo de etanol ejerce un efecto transitorio en la biosíntesis del hemo, inhibe las enzimas ALA-D, URO-D, COPRO-Ox y ferroquelatasa. (75, 76, 77, 78)

Se ha descrito que algunos fármacos como la clorpromazina (79), la amitriptilina (79) o la carbamazepina (80) son capaces de inhibir la actividad de la enzima ALA-D hepática e incluso eritrocitaria.

VI. CONCEPTO Y CLASIFICACION DE DIABETES MELLITUS (DM).-

La OMS (1985) define diabetes mellitus (DM) como "un estado crónico de hiperglucemia que a veces se acompaña de síntomas (sed intensa, orina profusa, adelgazamiento, estupor, coma y muerte en ausencia de tratamiento efectivo); a menudo estos síntomas son poco severos o están ausentes. La hiperglucemia y demás anormalidades bioquímicas resultan de una deficiencia en la producción o acción de la insulina, hormona que controla el metabolismo de la glucosa, pero también de las grasas y de los aminoácidos. Muchos procesos pueden causar el estado diabético". (81)

Shuman (82) define DM, como un síndrome caracterizado por hiperglucemia, hiperlipemia e hiperaminoacidemia.

Serrano Ríos (83) describe el estado diabético como "demasiado azúcar en la sangre y un alto riesgo de lesión macro-microvascular al que se llega por múltiples razones etiopatogénicas".

La DM debe ser considerada un síndrome y no una enfermedad, ya que responde a diversas causas, todas las que producen hiperglucemia crónica.

La OMS clasificó la DM en 1985 según se puede apreciar en la Tabla 4 (84, 85).

TABLA 4

CLASIFICACION DE DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA (OMS, 1985)

A.- CLASES CLINICAS

* DIABETES MELLITUS (DM)

Diabetes Mellitus Insulino-dependiente (DMID)

Diabetes Mellitus No-insulino-dependiente (DMNID)

a) No obeso

b) Obeso

Diabetes Mellitus relacionada con malnutrición (DMRM)

Otros tipos de diabetes asociados con ciertas condiciones y síndromes: 1) enfermedad pancreática; 2) enfermedad de etiología hormonal; 3) estados diabéticos inducidos por medicamentos o sustancias químicas; 4) anormalidades de la insulina o de sus receptores; 5) ciertas condiciones y síndromes genéticos; 6) grupo misceláneo.

* TOLERANCIA ALTERADA A LA GLUCOSA (TAG)

a) No obeso

b) Obeso

c) Asociado a ciertas condiciones y síndromes

* DIABETES MELLITUS GESTACIONAL (DMG)

B.- CLASES CON RIESGO ESTADISTICO

(Personas con tolerancia normal a la glucosa pero con alto riesgo de desarrollar diabetes)

* Anormalidad previa de la tolerancia a la glucosa

* Anormalidad potencial de la tolerancia a la glucosa

De todas las formas clínicas de diabetes mellitus, la OMS distinguió dos tipos básicos, ya que representan más del 95% del total de los diabéticos (86):

- 1.- Diabetes Mellitus Insulino-dependiente (DMID)
- 2.- Diabetes Mellitus No-Insulino-dependiente (DMNID)

Los términos DM insulino-dependiente y tipo 1, así como DM no-insulino-dependiente y tipo 2, son designaciones alternativas en la mayoría de los trabajos.

El término DM tipo 1 es una denominación descriptiva y requiere para su utilización, estudios de laboratorio que demuestren fenómenos inmunológicos y marcadores genéticos no siempre disponibles. La designación de DM tipo 2 se realiza cuando se excluye el tipo 1.

La clasificación de la OMS de 1985, evita la utilización de los términos DM tipo 1 y tipo 2. (86)

El término "dependencia insulínica" (86, 87) no es sinónimo de tratamiento insulínico. Indica que el paciente está en riesgo de sufrir cetoacidosis, coma y muerte si no recibe tratamiento insulínico.

Algunos pacientes clasificados como DMNID reciben tratamiento insulínico para controlar su hiperglucemia, pero no sufrirían cetoacidosis si se suspendiera este tratamiento.

La dependencia insulínica es difícil de establecer en algunos casos, por ésto la OMS admite la existencia de dependencia insulínica cuestionable. De igual forma reconoce la dificultad para definir a este grupo de paciente y por tanto para incorporarlos a la clasificación.(88)

Es difícil clasificar a diabéticos de edad media, no obesos, en tratamiento con insulina por responder mal a otras terapéuticas y de los que ignoramos su historia clínica.

Así mismo, habría que replantearse la clasificación en pacientes diagnosticados de DMNID, en tratamiento con insulina que desarrollan cetosis severa cuando sufren un traumatismo grave, daño cerebral o infección.

VII. CRITERIOS DIAGNOSTICOS Y PARAMETROS BIOQUIMICOS EN DM.-

Los criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus establecidos por la OMS (1985), la asociación Europea para el estudio de la Diabetes y el Grupo Nacional de Datos de Diabetes de los Estados Unidos son (88, 89) :

1. Síntomas clásicos (poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso) y glucemia en plasma superior a 200 mg/dl (11,2 mmol/l).
2. Glucemia en plasma, tras 8 horas de ayuno nocturno, igual o superior a 140 mg/dl (7,8mmol/l), determinada en dos ocasiones diferentes.
3. Cifras de glucemia en plasma, iguales o superiores a 200 mg/dl (11,1mmol/l) a las dos horas de la ingesta de 75 g de glucosa en los adultos y 1,75 g/kg de peso ideal en los niños, hasta un máximo de 75 g.(86)

VII. 1. GLUCEMIA.-

Demostrar la existencia de un estado permanente o crónico de hiperglucemia es imprescindible para diagnosticar una DM.

En las personas sanas y en las mujeres no gestantes, la glucosa en plasma o suero está comprendida entre 60 y 115 mg/dl.

La glucosa debe ser determinada en sangre capilar, que es equivalente a sangre arterial, o bien en plasma o suero venoso. Si la glucosa se determina en sangre total es preciso hacer una corrección, pues influye el valor del hematocrito entre otras cosas. La glucemia en sangre total es 15% inferior a los valores plasmáticos o capilares.(86)

Valores de glucosa en plasma iguales o superiores a 140 mg/dl, tras un ayuno (86) de 8-16 horas -glucemia basal-, en más de dos ocasiones, son diagnósticos de DM.

VII. 2. SOBRECARGA ORAL DE GLUCOSA.-

La prueba de la sobrecarga oral de glucosa se realiza en personas con valores de glucemia basal comprendidos entre 115-139 mg/dl, valores que no permiten el diagnóstico de DM.

Se debe realizar según los criterios del Comité de expertos en DM de la OMS. Se determina la glucemia basal y a las dos horas de la ingestión de 75 gramos de glucosa en los adultos, y de 1,75 gramos de glucosa por Kg de peso ideal en los niños, hasta un máximo de 75 gramos.

En Europa se administraban 50 gramos de glucosa y en EEUU 100 gramos, pero la dosis europea era insuficiente y la de EEUU producía náuseas con frecuencia. Los 75 gramos se disuelven en 250-350 ml de agua, deben ser consumidos en 5 minutos como máximo.

Los tiempos de extracción de sangre son a los 0 y 120 minutos. El Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes mantiene la utilidad de hacer extracciones

cada 30 minutos, hasta dos horas. Esta actitud no parece proporcionar un mayor beneficio en la exactitud diagnóstica, según los criterios de la OMS.

Se considera patológica la prueba de sobrecarga oral de glucosa cuando a las dos horas de la administración de glucosa, la glucemia es superior a 140 mg/dl. Si la glucemia, a las dos horas, está comprendida entre 140-199 mg/dl, se considera una tolerancia alterada a la glucosa, si es superior a 200 mg/dl es diagnóstica de DM.(Tabla 5)

TABLA 5

Valores diagnósticos en el test de tolerancia oral de glucosa (según la OMS, 1985)

	Concentración de glucosa en mg/dl (mmol/litro)*			
	Sangre total		Plasma**	
	Venoso	Capilar	Venoso	Capilar
Diabetes Mellitus				
Ayunas	≥ 120 (≥ 6,7)	≥ 120 (≥ 6,7)	≥ 140 (≥ 7,8)	≥ 140 (≥ 7,8)
2 horas tras la sobrecarga de glucosa	≥ 180 (≥ 10)	≥ 200 (≥ 11,1)	≥ 200 (≥ 11,1)	≥ 200 (≥ 12,2)
Tolerancia oral de glucosa alterada				
Ayunas	< 120 (< 6,7)	< 120 (< 6,7)	< 140 (< 7,8)	< 140 (< 7,8)
2 horas tras la sobrecarga de glucosa	120-180 (6,7-10)	140-200 (7,8-11,1)	140-200 (7,8-11,1)	160-220 (8,9-12,2)

* Por razones prácticas, y de forma opuesta al Informe de la OMS (1985), se colocan en lugar preferente las cifras facilitadas en mg/dl.

** Plasma o suero.

En los enfermos diabéticos encontramos alteraciones bioquímicas que por si mismas no nos permiten realizar el diagnóstico de diabetes, pero sirven para corroborarlo, ayudan a clasificar al paciente, según la OMS, y algunas son especialmente útiles para el control metabólico de la DM.

VII. 3. HEMOGLOBINA GLICOSILADA.-

La hemoglobina (Hb), en un adulto normal, está compuesta: 90-97% HbA1 (alfæ betæ); 2% HbA2 (alfæ deltæ); 1% HbF (alfæ gammæ). En 1958 se aislaron los componentes menores de la hemoglobina humana (90) y en 1968 se describió que uno de estos componentes menores, la hemoglobina glicosilada A1c, estaba aumentada en los enfermos de diabetes (91)

Las hemoglobinas glicosiladas se forman por la condensación de un azúcar en el grupo N terminal de la valina, situada en la cadena beta de la hemoglobina A. Encontramos cuatro tipos diferentes, según el grado de fosforilación del azúcar:(92)

HbA1a1 unida a fructosa difosfato	0.2%
HbA1a2 unida a glucosa 6-fosfato	0.2%
HbA1b no se conoce a lo que está unida	3.4%
HbA1c unida a glucosa	90%

En la práctica clínica se determina el total o la más abundante HbA1c. Existe una correlación entre ambas de 0.97

La glicosilación es un proceso no enzimático que se realiza en dos fases. En la primera fase, rápida, se forma un compuesto base de Schiff reversible, aldimina. La segunda fase es lenta e irreversible, se forma la cetoamina, que permanece unida a la hemoglobina.(Fig 10)

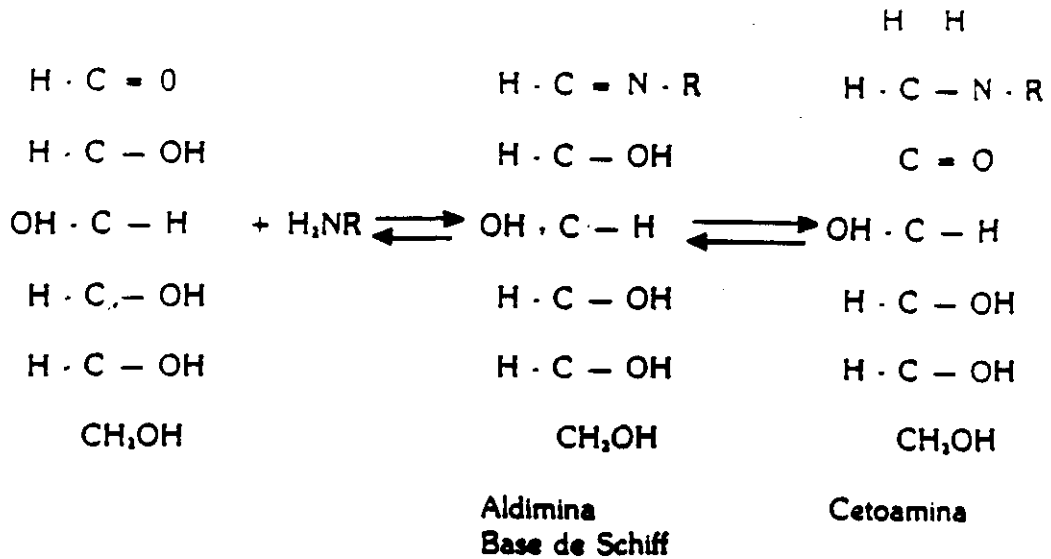


Figura 10. Glicosilación no enzimática de la hemoglobina (93).

La cantidad de proteína glicosilada depende del nivel medio de glucemia (94, 95, 96), así como de la vida media de la proteína. Para la HbA1c es de 120 días, que constituye la vida media del hematíe. (**Fig 11**).

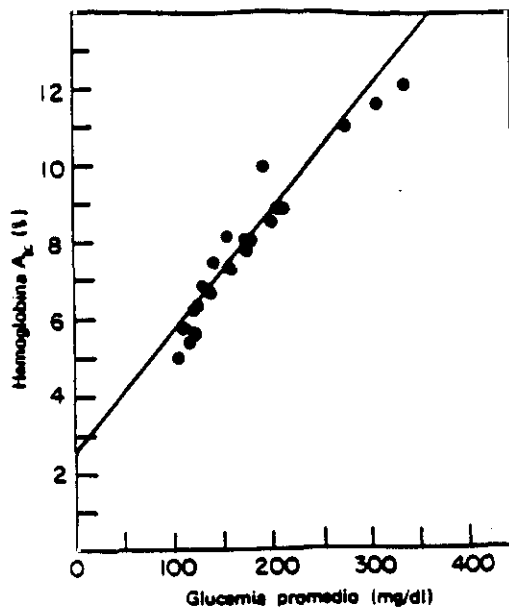


Figura 11. Relación entre la hemoglobina glicosilada (HbA1c) y la glucemia promedio (97).

La HbA1 puede ser determinada por varios métodos: cromatográficos, electroforéticos, colorimétricos o químicos e inmunológicos. Los valores obtenidos con distintos métodos son muy variables, por ello cada laboratorio debe decidir sus valores normales y tener sus controles internos.

Los valores de HbA1c estable se correlacionan con los niveles medios de glucemia, en las 4-8 semanas previas a la extracción. La HbA1c lábil, aldamina, puede modificarse entre 1 y 2% si se han producido cambios bruscos en los niveles de glucemia, cercanos a la extracción.(98)

La HbA1c es de utilidad para el control del tratamiento de la DM. No se debe emplear para realizar el diagnóstico, aunque se puede usar para su confirmación, ya que con gran frecuencia se solapan los valores normales y los de pacientes diabéticos, por fallos en los controles internos del laboratorio.

VII. 4. FRUCTOSAMINA.-

Al determinar la fructosamina se están valorando todas las proteínas que tienen restos de hexosas mediante uniones 1-amino-1-deoxi-D-fructosamina.

Sólo refleja los niveles medios de glucemia de las 2-3 semanas previas a la extracción. Sirve como control terapéutico, siempre que se utilicen los valores iniciales del propio paciente como referencia. Se modifican antes que las de HbA1c, por tanto es más sensible (99, 100).

La fructosamina no se puede emplear para el diagnóstico de la DM, por el frecuente solapamiento entre las cifras de la población normal y la diabética.

La glicosilación no enzimática también se produce en otras proteínas, como: albúmina plasmática, lipoproteínas de baja densidad, proteínas de la membrana eritrocítica, las del cristalino o la proteína básica de la mielina.

VII. 5. PEPTIDO C.-

La insulina se sintetiza en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, como un precursor, proinsulina. Esta al dividirse enzimáticamente, origina insulina y péptido C en cantidades equimolares.

El valor del péptido C nos indica la capacidad excretora de las células beta del páncreas. Es mayor en jóvenes y adultos que en niños (101).

Se determina por radioinmunoensayo en suero y en orina. Sólo se encuentra el 5% en la orina, ya que el resto es metabolizado por el riñón. En los enfermos diabéticos con nefropatía, los valores del péptido C están alterados.

La prueba más utilizada consiste en la administración de 1 mg de glucagón intravenoso. Se determina el valor basal del péptido C y a los siete minutos de la administración del glucagón, en condiciones normales su valor se triplica.

En la DMID, el valor basal es muy inferior a lo normal y no hay respuesta al glucagón. En la DMNID, el valor basal es bajo, normal o alto y la respuesta al glucagón es pobre.

El péptido C nos indica la reserva insulínica del páncreas y puede ayudar a distinguir DMID y DMNID.

VIII. DMID.-

La DMID representa entre 10 a 15% del total de diabéticos. Su edad de inicio mas frecuente es entre 10-14 años, desciende alrededor de los 18-20 años llegando al mínimo después de los 25 años (**Fig 12**) (93, 102).

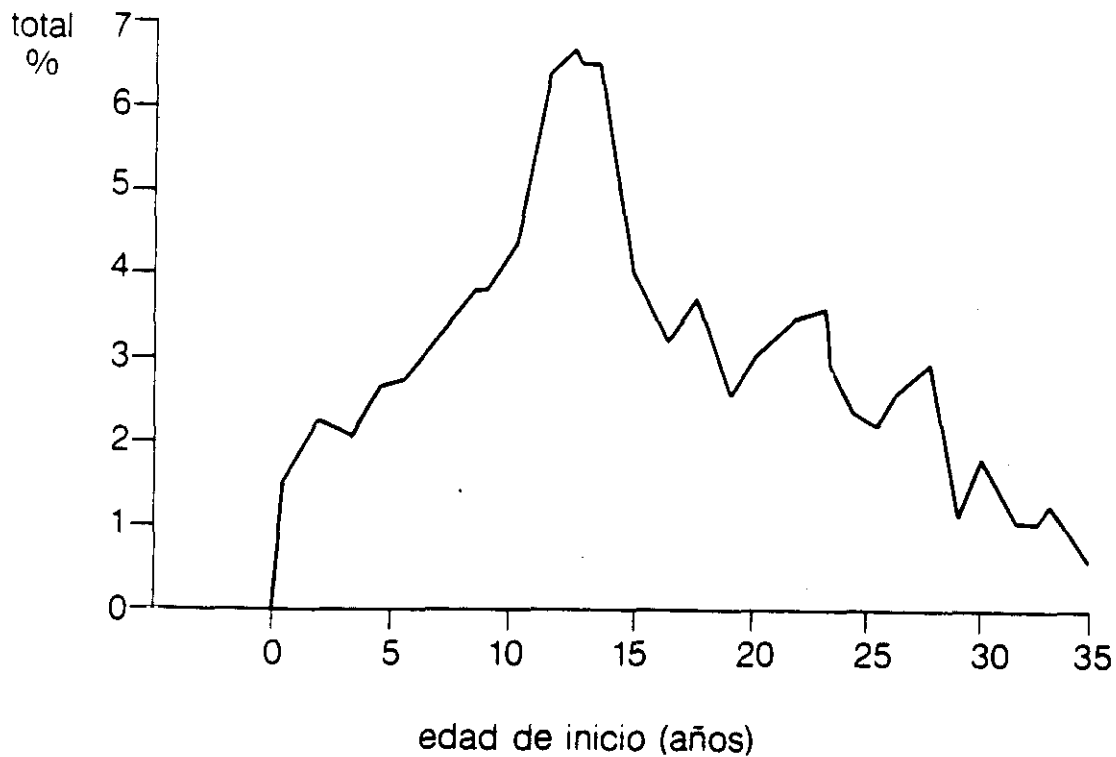


Figura 12. Edad de inicio de la DMID (93).

La mayoría de los estudios muestran una mayor afectación del sexo masculino (103, 104). Es la más frecuente de las enfermedades crónicas importantes en la infancia.

El 95% de los niños diabéticos sufren DMID. Dentro del 5% restante, una parte, el 3%, sufre DMNID esporádica (105) o DMNID de origen familiar, descrita por Fajans (106) y denominada MODY (Maturity-Onset Diabetes of Young). Otra parte presenta una intolerancia hidrocarbonada asociada a un síndrome genético.

La incidencia y prevalencia varía por factores genéticos y raciales, en los países escandinavos presentan las mayores tasas. La incidencia en la Comunidad de Madrid es 11,3/100000/año (población total:4.780.572; población inferior a los 15 años:1.105.243) (107).

La mayoría de los pacientes con DMID presentan una historia clínica de 2-3 semanas de evolución, con los síntomas clásicos: poliuria, polidipsia y polifagia. El resto suele evolucionar en 48 horas, con la presencia de cetoacidosis y coma diabético.

En una serie de 115 niños diabéticos atendidos en el Hospital 12 de Octubre durante 1980-86, la mitad iniciaron su DM con un episodio de cetoacidosis; de ellos una cuarta parte llegaron en coma diabético al hospital. (108)

El inicio tan brusco en la DMID es causado por la destrucción completa (85-90%) (87) de las células beta del páncreas, por una predisposición genética sobre la que actúan factores ambientales: infecciones virales (coxsackie, citomegalovirus, rubeola congénita, hepatitis) o toxinas químicas (estreptozotocina, haloxano, clorozotocina). (Fig 13)

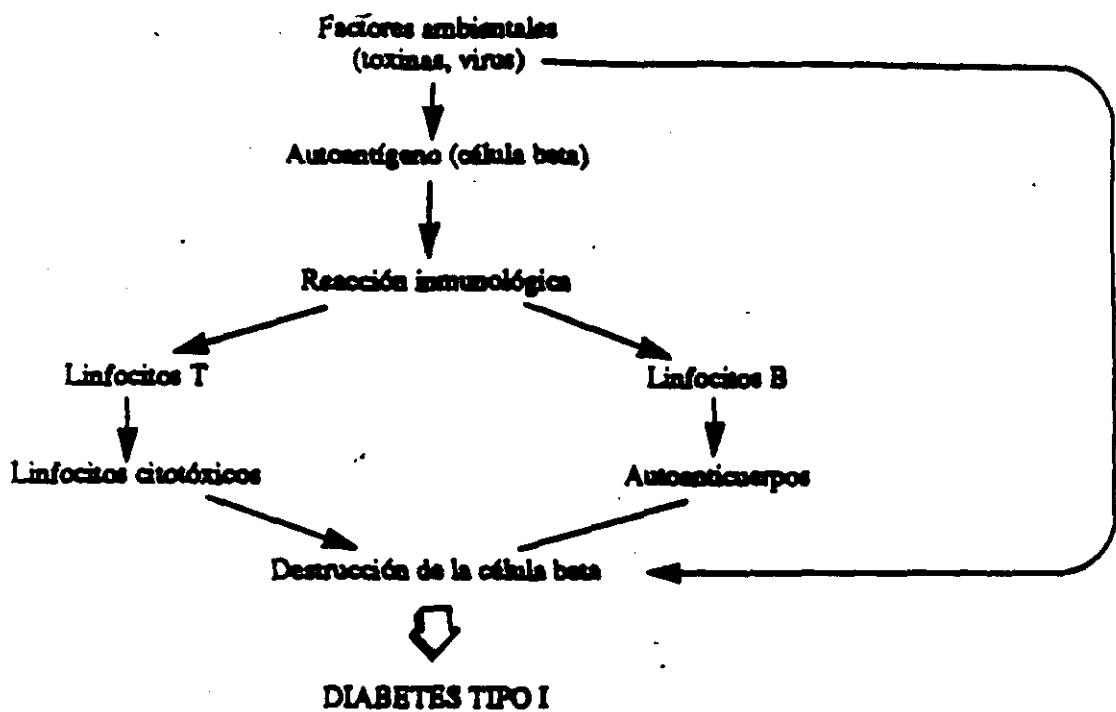


Figura 13. Posible secuencia de fases en la patogenia de la DMID

La predisposición genética se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6, donde se codifican los antígenos de clase II del sistema mayor de histocompatibilidad, locus D, subloci DP, DQ, DR. Los fenotipos DR3 y/o DR4 se asocian con DMID y el fenotipo DR2 confiere resistencia a la enfermedad. Existe una concordancia para padecer DMID, de 10-20% entre hermanos con HLA idéntico.(109)

La destrucción de las células beta del páncreas es un proceso autoinmune. Encontramos:

- 1.- Anticuerpos anti-islotos pancreáticos. Se trata de IgG contra el citoplasma de las células insulares. Están presentes al inicio de la enfermedad en un 90-95% de los casos (110), disminuyen con el tiempo.
- 2.- Anticuerpos anti-insulina, presentes en el 16-50% de los pacientes al inicio de la enfermedad.(110)
- 3.- Anticuerpos contra la proteína 64 Kd, situada en la superficie de la célula beta, que representa el mas precoz marcador autoinmune. (111)

El grupo de Karjalainen y cols (112) encontraron en los adultos que desarrollaban DMID una mayor reserva insulínica, valorada por el péptido C. Por tanto la función beta estaba más conservada.

IX DMNID.-

La DMNID representa del 80 al 85% de los diabéticos. La edad de comienzo es de modo habitual superior a 35 años (Shuman 1988) (79), con aumento de la incidencia según se aumenta la edad. Es extremadamente frecuente a partir de los 65 años.

Encontramos una mayor incidencia en sexo femenino, pero si se tiene presente el índice de masa corporal, la diferencia entre sexos desaparece, ya que las mujeres son significativamente más obesas que los hombres.(93)

La diabetes que se inicia en la edad madura-vejez se clasifica en la mayoría de los casos como DMNID, sólo un 10-16% (113) se clasifica como DMID aunque se trate de pacientes maduros por requerir tratamiento con insulina desde el diagnóstico de la enfermedad.

La tolerancia a la glucosa disminuye con los años, por un aumento de la resistencia a la insulina debida a la edad (114, 115). Este es el motivo por el que la incidencia de DMNID está sobrevalorada.

Las causas por las que se altera el metabolismo hidrocarbonado con la edad son:

- 1.- Modificaciones en el tipo de vida, con disminución de la actividad física y dieta rica en grasa y pobre en fibra.
- 2.- Mayor incidencia de enfermedades, con frecuentes estancias en cama y uso de fármacos.

Existe una predisposición genética para desarrollar la enfermedad, localizada en el cromosoma 11, en una zona polimórfica del DNA, próxima al gen de la insulina (116). El gen que codifica la enzima glucógeno sintetasa, localizado en el cromosoma 19, parece estar relacionado con esta forma de diabetes; la presencia del alelo A2 se asocia, de forma frecuente, con defecto en la estimulación de insulina e hiperglucemia (117).

El 43-45% de los familiares de primer grado de un paciente con DMNID pueden desarrollar la enfermedad (118). Entre gemelos monocigóticos existe una concordancia para DMNID de un 91%, el resto presentan una curva de tolerancia a la glucosa alterada (119)

En el páncreas encontramos una fibrosis acinar e hialinización de los islotes, descrito por Opie hace 90 años (120). La disminución de células beta es

muy rara en DMNID, la pérdida de tejido acinar exocrino puede producir un aparente aumento de la densidad de islotes. (121)

En DMNID hay una disfunción de las células beta con alteraciones en la cuantía y en la pulsatilidad de la secreción de insulina. (122)

La resistencia a la insulina está presente en estos pacientes; consiste en un descenso menor de la glucemia como respuesta a una cantidad determinada de insulina comparado con una población normal. Esta resistencia se ha detectado en obesos, sin diabetes mellitus, acompañada de una reducción del número de receptores para la insulina, alteración confirmada así mismo en enfermos diabéticos. En los diabéticos con importante hiperglucemia en ayunas se confirmó un defecto en el transporte de la glucosa a nivel del post-receptor (123). (Fig 14)

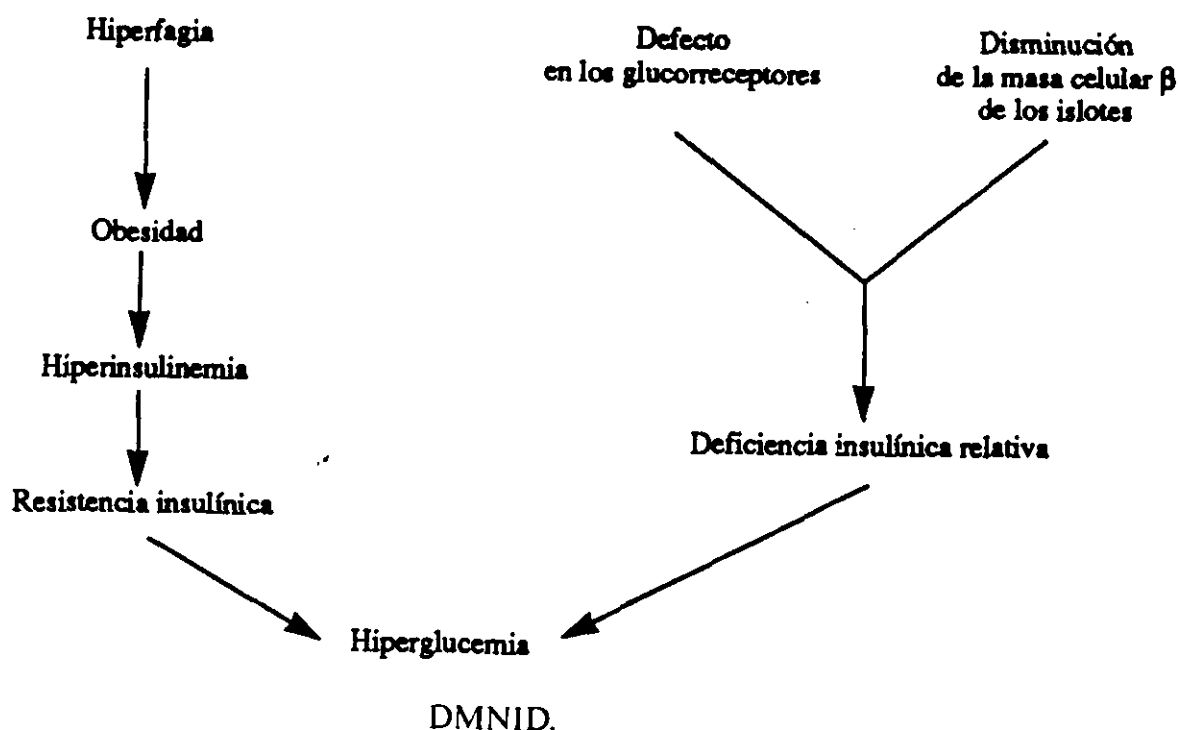


Figura 14. Etiopatogenia de la DMNID (111).

El paciente con DMNID suele ser obeso. El comienzo insidioso, con síntomas inespecíficos: astenia, adelgazamiento, infecciones repetidas, prurito...etc.

En general responden al tratamiento dietético o a las sulfonilureas, sólo el 20-30% requieren insulino-terapia.

X. CRITERIOS DE INCLUSION EN DMID Y DMNID.-

La OMS estableció los dos tipos básicos de DM, Insulino-Dependiente y No-Insulino-Dependiente, basándose en que los datos definitorios podían ser detectados en la historia clínica del paciente. Los criterios son:

- 1.- Edad de aparición de la enfermedad. La DMID suele presentarse en jóvenes. La DMNID suele comenzar en personas maduras, con edad superior a 35 años.
- 2.- Forma de comienzo: en DMID es brusca, con los síntomas clásicos (poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso) y en algunos casos con presencia de cetoacidosis. En DMNID el comienzo suele ser insidioso (82, 87).
- 3.- En DMID, tratamiento con insulina desde el inicio de la enfermedad.

Shuman en 1988 (82), estableció unos criterios distintivos de ambos tipos de diabetes, expuestos en la tabla de la siguiente página.

FACTOR	TIPO I	TIPO II
Edad de aparición	Corrientemente en jóvenes, pero puede ocurrir a cualquier edad	Corrientemente sobre los 35 años, pero puede ocurrir a cualquier edad
Forma de aparición	Generalmente brusca	Insidiosa
Susceptibilidad genética	HLA relacionado con DR3 Y DR4, y otros	Bagaje genético no relacionado con HLA
Factores ambientales	Virus, toxinas, estimulación autoinmune	Obesidad. Alteraciones de la nutrición
Insulina endógena	Mínima o ausente	Respuesta estimulada es: 1) secreción retrasada pero suficiente; 2) reducida pero no ausente
Estado nutricional	Delgado, estado catabólico	Obeso o normal
Síntomas	Sed, poliuria, polifagia, astenia, adelgazamiento	Ninguno o escasos
Cetosis	Proclive: en la aparición o en ausencia de insulina	Resistente, salvo en estrés o infección
Control de la diabetes	Difícil, con fluctuaciones de la glucemia	Variable
Manejo dietético	Esencial	Esencial; e incluso suficiente para el control de la glucemia
Insulina	Requerida siempre	Requerida por el 20-30%
Sulfonilureas	No eficaz	Eficaz
Complicaciones vasculares y neurológicas	En la mayoría tras 5 años o más de diabetes	Frecuente

XI. DM EXPERIMENTAL.-

En los últimos años se han utilizado diferentes drogas que inducen una DM experimental con alteraciones metabólicas e histológicas que recuerdan una DMID. Las drogas más utilizadas han sido halloxano y estreptozotocina (STZ).

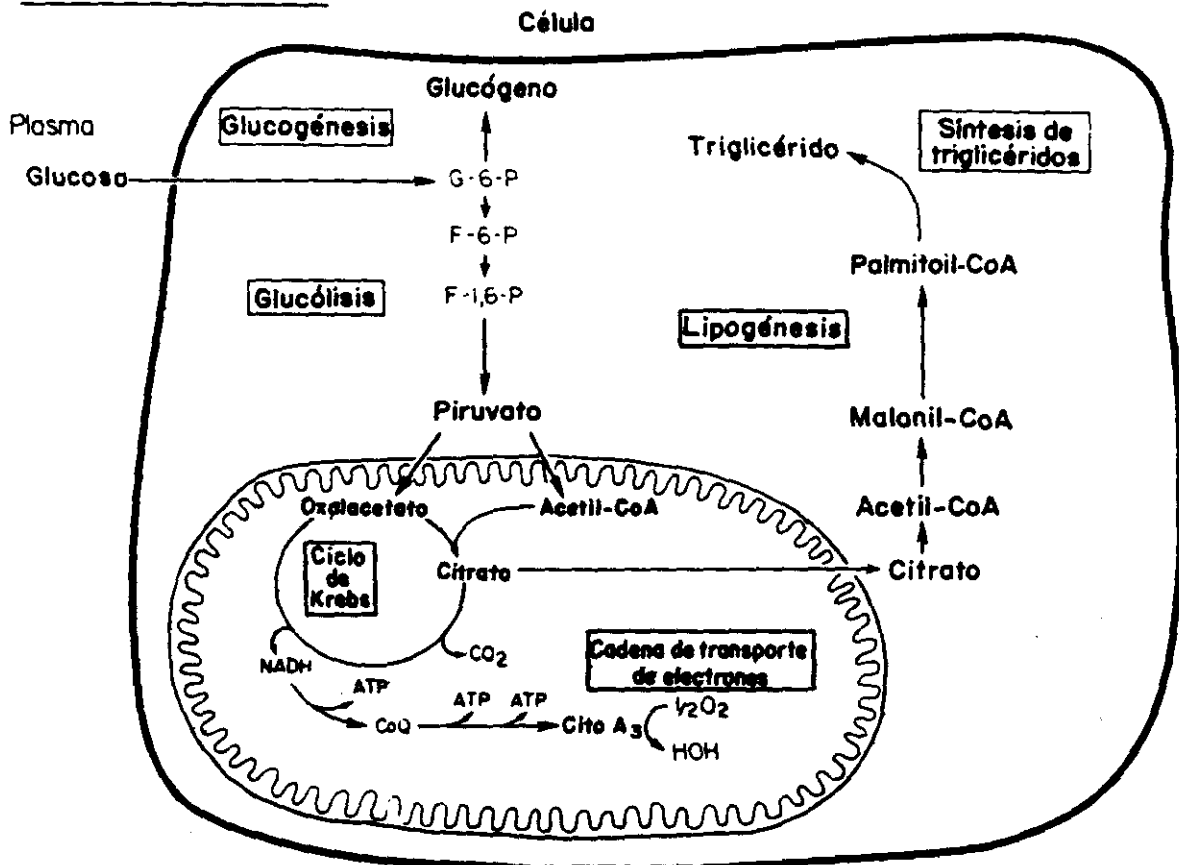
La STZ es un antibiótico de amplio espectro aislado de cultivos de *Streptomyces acromogenes* y sintetizado con posterioridad (124); sus propiedades diabetógenas fueron descritas por Rakietyen y col (125), es capaz de producir en las células beta del páncreas una degranulación B casi completa. La mayoría de los autores emplean STZ para inducir DM experimental, debido a que su potencia como agente diabetógeno es mayor que la que presenta el halloxano (126).

La dosis de STZ empleada por diferentes autores varía de 30 mg/Kg (127) a 65 mg/Kg (128, 129, 130); esta última es la dosis más empleada ya que se consigue una buena inducción de DM con baja mortalidad.

XII. ALTERACIONES METABOLICAS EN DM.-

La insulina es la hormona anabólica principal (131) (**Fig 15**). El aumento del glucagón plasmático, junto a la disminución de la insulina, representa el inicio del catabolismo (131) (**Fig 16**), al que contribuyen la adrenalina, el cortisol y la hormona de crecimiento.

VIAS ANABOLICAS



44

Figura 15. Esquema de las vías anabólicas en una célula hepática (131).

VIAS CATABOLICAS

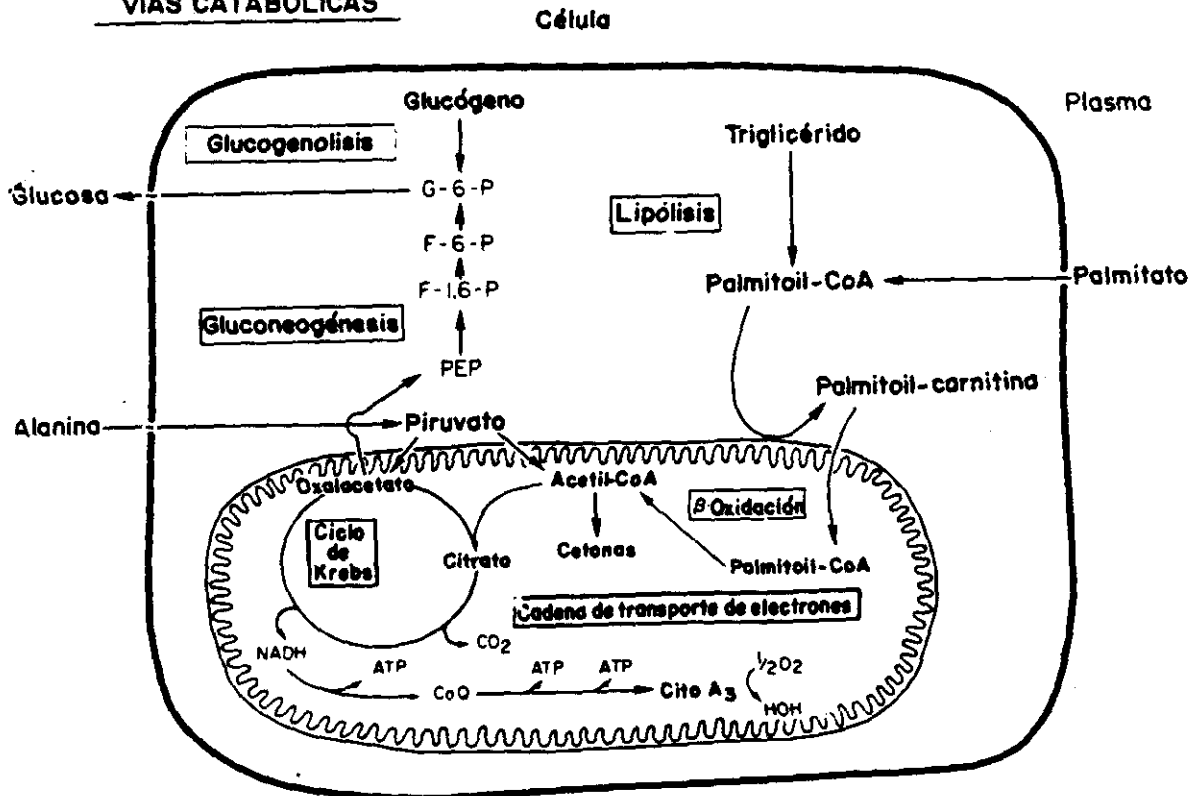


Figura 16. Esquema de las vías catabólicas en una célula hepática (131).

En la DM hay una disminución de insulina circulante, lo que permite el aumento de la concentración de glucagón. La consecuencia es la elevación, en el hígado, de monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico). Esto conduce a la hidrólisis del glucógeno hepático, la activación de la gluconeogénesis e inhibición de la glucólisis.

Los substrato para la gluconeogénesis hepática son lactato, glicerol y aminoácidos. El lactato se obtiene del glucógeno almacenado en el músculo. Produce el 20% de la glucosa hepática, por el ciclo de Cori. El glicerol se origina de la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo.

Los aminoácidos son el substrato básico en la neoglucogénesis. La alanina es el aminoácido más captado por el hígado. La neoglucogénesis se produce principalmente en el hígado, pero cuando la deficiencia de insulina es prolongada, también se origina en el riñón, que utiliza glutamina de forma preferente. Los aminoácidos utilizados provienen de proteínas estructurales en mayor cantidad que de depósitos no funcionantes.

La deficiencia de insulina persistente conduce a la oxidación del tejido adiposo, con la formación de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos, utilizados como fuente de energía por los tejidos.

En condiciones normales, los ácidos grasos captados por el hígado son reesterificados para obtener triglicéridos, que son almacenados o se liberan como lipoproteínas de baja densidad.

El glucagón al desinhibir la enzima carnitina-acil-transferasa-I de los hepatocitos, favorece la oxidación de los ácidos grasos y la síntesis de cuerpos cetónicos. La velocidad de formación de acetoacetato y b-hidroxibutirato, depende de la velocidad de liberación de ácidos grasos en la periferia.

XIII. PORFIRIAS Y DM.-

La asociación entre porfirias y DM fue descrita hace más de 40 años por Sterling, Silver y Ricketts en 1949 (132); estos autores descubrieron DM en tres de siete pacientes diagnosticados de porfiria aguda intermitente (PAI). En 1956 Berman y Bielicky (133) encontraron DM en 15 de 36 pacientes con porfiria cutánea tarda (PCT) que es la forma más frecuente de porfiria (51), así mismo estos autores estudiaron una serie de 1250 varones con DM de los que el 1% sufría una PCT.

En los últimos 20 años la mayoría de los tratados de dermatología (134, 135, 136, 137), así como diferentes autores (138, 139, 140), establecen que el 25% de los pacientes con PCT sufren una DM, con una incidencia de diabetes en estos pacientes estimada en un 5% (138). Sin embargo, otros autores encuentran una frecuencia más baja y según sus trabajos sólo el 15% de los pacientes con PCT presentarían una DM (141, 142).

Por otro lado, se han descrito frecuentes alteraciones del metabolismo hidrocarbonado en pacientes diagnosticados de diferentes tipos de porfiria, sobre todo en los que presentan una PCT o una PAI.

La mayoría de los pacientes con PCT presentan alterada la sobrecarga oral de glucosa, con valores de glucemia superiores a 160 mg/dl a las dos horas de la administración de glucosa o valores superiores a 200 mg/dl a lo largo de la prueba. La frecuencia de esta alteración oscila según diferentes autores entre un 60% (141) y un 87% (138). Así mismo, se ha descrito en los pacientes con PCT una secreción excesiva de insulina en respuesta a la sobrecarga oral de glucosa (138, 142). Aunque los enfermos cirróticos suelen presentar intolerancia a la sobrecarga oral de glucosa con hipersecreción de insulina, menos del 15% (51) de los pacientes con PCT presentan cirrosis, lo que podría explicar parte de las

alteraciones encontradas en el metabolismo hidrocarbonado, pero no las justificaría.

De igual forma, la mayoría de los pacientes con PAI sintomática (87%) (143, 144) presentan alterada la prueba de sobrecarga oral de glucosa junto a una secreción de insulina retrasada y excesiva, similar a la observada en DMNID; sin embargo, tanto la curva de glucemia como la secreción de insulina volvían a la normalidad cuando el paciente se recuperaba del ataque agudo. Así mismo, los pacientes con PAI sintomática que reciben glucosa oral o intra-venosa, según lo aconseje su estado clínico, en una cantidad entre 500-600g/24h presentan descenso de la eliminación urinaria de ALA y PBG que suele acompañarse generalmente de mejoría clínica (144, 145); a esta capacidad de la glucosa se la denomina "efecto glucosa" y también ha sido descrito en pacientes diagnosticados de porfiria variegata o coproporfiria hereditaria durante los períodos sintomáticos (145). Similares resultados tanto bioquímico como clínicos se han observado después de la infusión intravenosa de hemo-albúmina en pacientes sintomáticos de PAI (146).

El denominado "efecto glucosa" es debido a la capacidad de la glucosa para reprimir la actividad de la enzima ALA-S hepática previamente estimulada en el curso de una PAI real (145) o bien provocada en el laboratorio por la administración de aliliso-propil-acetamida (AIA) (147, 148, 149). También se produce el "efecto glucosa" en ratas previamente diabéticas a las que se induce una PAI por AIA (149). La enzima ALA-S es muy importante en la ruta biosintética del hemo, ya que limita su síntesis.

Se han publicado diferentes casos de ataques agudos de PAI precipitados por ayuno (150, 151), así como ausencia de los mismo en pacientes con PAI y DMNID durante el período silente su diabetes (152).

En resumen: las porfirias y la DM están asociadas; los pacientes porfíricos suelen mostrar alterado el metabolismo hidrocarbonado y la glucosa es capaz de modificar la ruta biosintética del hemo previamente alterada en los ataques agudos de porfiria, ya se trate de PAI, variegata o coproporfiria.

En DM son frecuentes los trabajos que estudian las hemoproteínas, que constituyen una parte del producto final de la ruta biosintética del hemo en tejido hepático. Todos ellos se han realizado en DM experimental y estudian principalmente una hemoproteína, el citocromo P450 debido a su papel en la oxidación de muchos productos químicos endógenos: hormonas esteroides y exógenos: barbital, codeína, clorpropamida (153, 154, 155, 156). En algunos estudios sólo se describe la elevación que presentan los animales diabéticos en el contenido de este citocromo hepático (157, 158, 159, 160) que se ha observado más marcada en ratas diabéticas hembras (161); otros autores describen la familia del citocromo P450 cuya elevación puede ser atribuida a la DM, se trata de la familia P450-2-E-1 también denominada 450ac ó 450j, estos mismo autores opinan que los motivos que quizá pueden provocar este aumento sean dos alteraciones frecuentes en la DM mal controlada: la elevación de los cuerpos cetónicos (161, 162, 163, 164) y el descenso de la secreción de la hormona de crecimiento (161).

Sin embargo, llama la atención la escasez de trabajos que estudien la propia ruta biosintética del hemo en DM; la mayoría se han realizado en DM experimental, únicamente en tejido hepático y en algunos casos con resultados contradictorios.

Cánepa y cols encuentran elevada la cantidad de citocromo P450 en hepatocitos de ratas diabéticas y aumentada la actividad de las enzimas ALA-S y ferroquelatasa (165); después de la administración de fenobarbital la cantidad de citocromo se incrementaba 3 veces más en los hepatocitos de ratas

diabéticas que en los controles y la actividad de ambas enzimas 1,5 veces (166). Bitar y Weiner (157) observan en sus ratas diabéticas un aumento de la cantidad total de hemo y de citocromo P450, descenso de la actividad de la hemo-oxigenasa microsomal y de la enzima ALA-D, pero en contradicción con Cánepa y cols también encuentran descendida la actividad de la enzima ALA-S que no se recupera con la administración de cloruro de cobalto (CoCl_2), compuesto estimulador de esta enzima.

La ruta biosintética del hemo en hematíes se ha estudiado en ratones diabéticos; se ha observado un descenso de la actividad enzimática de ALA-D tanto en hematíes como en tejido hepático, sin modificarse las enzimas PBG-D ni URO-D (167). Batlle y cols (139) estudiaron esta ruta metabólica en pacientes con DM, con PCT y con ambas enfermedades encontraron descendida la actividad de la enzima ALA-D en el grupo con DMID y con la asociación PCT-diabetes, aunque no se especifica si se trata de DMID o bien DMNID, sin embargo la actividad de la enzima siempre se mantuvo dentro los valores de referencia del laboratorio.

En resumen, en DM experimental y en tejido hepático se ha descrito una elevación de la cantidad total de hemo y de citocromo P450 junto a un descenso de la actividad microsomal de la hemo-oxigenasa y de la enzima de ALA-D (157); también en DM experimental, Rossetti y col (168) observaron un descenso paralelo de la actividad enzimática de ALA-D en eritrocitos y en tejido hepático. Sin embargo, los resultados sobre la actividad enzimática de ALA-S hepática son contradictorios (157, 165, 166). En pacientes diabéticos se ha descrito un descenso de la actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria respecto al grupo control, aunque siempre dentro de los valores de referencia del laboratorio (139).

OBJETIVOS

En la introducción de esta tesis se ha expuesto que existe una asociación entre las porfirias y la DM (132) que es más manifiesta en el caso de la porfiria cutánea tarda (133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140). También se ha descrito que el metabolismo hidrocarbonado se encuentra frecuentemente alterado en los pacientes porfíricos (138, 141, 143, 144). De igual forma se ha constatado la capacidad de la glucosa para modificar la ruta biosintética del hemo, cuando ésta se encuentra previamente alterada, en el curso de un ataque agudo de porfiria (144, 147, 148, 149).

Por todo lo expuesto y ya que se ha descrito en pacientes diabéticos un ligero aumento de la excreción de porfirinas urinarias (169, 170, 171), parecía adecuado estudiar la ruta biosintética del hemo en la DM; algunos autores han observado alteraciones de esta ruta en la DM experimental, aunque han dirigido su atención a esta ruta biosintética en tejido hepático (157, 165, 166) y únicamente el 15% del hemo que se sintetiza en el organismo tiene como destino este tejido. Son muy escasos los estudios de esta ruta en eritrocitos tanto en DM experimental (168) como en pacientes diabéticos (139, 172), a pesar de que casi el 85% del hemo del organismo se sintetiza en la médula ósea.

En la presente tesis nos proponemos estudiar si se encuentra alterada la ruta biosintética del hemo en hematíes de pacientes diabéticos. Por este motivo estudiaremos dos de las enzimas que intervienen en esta ruta: ALA-D y PBG-D, ya que al carecer los hematíes de mitocondrias no es posible determinar la actividad de las enzimas mitocondriales de la ruta hemo (ALA-S, COPRO-OX, PROTO-OX, ferroquelatasa). Las enzimas ALA-D y PBG-D catalizan el segundo y tercer paso de la síntesis del hemo.

Nuestra hipótesis de trabajo es que las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado de los pacientes diabéticos modifican la actividad de esas dos enzimas citosólicas de la ruta del hemo. En caso afirmativo, la determinación de

la actividad de las enzimas ALA-D y PBG-D eritrocitarias podrían ser útiles como parámetros indicadores del control del metabolismo hidrocarbonado en la DM.

Utilizamos un modelo experimental de DM inducida por la administración de estreptozotocina, con ello se pretende reproducir y confirmar los resultados encontrados en pacientes diabéticos. En este modelo experimental se estudian las mismas enzimas de la ruta biosintética del hemo que en los pacientes, pero tanto en hematíes como en tejido hepático. Igualmente pretendemos valorar si se modifica la actividad de estas enzimas en relación o no con las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado.

Además, nos propemos determinar también la concentración de porfirinas en orina, plasma y hematíes con el fin de valorar la posible interrelación entre el trastorno hidrocarbonado y la presencia de hiperporfirinuria y/o hiperporfirinemia.

MATERIAL Y METODOS

I. PACIENTES.-

En el presente estudio se incluyeron treinta y dos pacientes diagnosticados de Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente (DMID), 16 mujeres y 16 varones, con edades comprendidas entre 3 y 34 años (media 15.09 ± 6.5 años). Recibían tratamiento en el Departamento de Pediatría y en el Servicio de Medicina Interna III, Hospital Clínico de San Carlos.

Noventa y nueve pacientes diagnosticados de Diabetes Mellitus No-Insulino-Dependiente (DMNID), 59 mujeres y 40 varones. Su edad oscilaba entre 20 y 83 años (media 62.4 ± 11.01 años). Procedían del Servicio de Medicina Interna III de este mismo Hospital.

Se incluyeron en el estudio dos grupos control: uno constituido por 20 individuos, 9 mujeres y 11 varones, con edad comprendida entre 2 y 19 años (media 10.25 ± 5.7 años). El segundo grupo integrado por 26 personas, 11 mujeres y 15 varones, cuya edad oscilaba entre 54 y 76 años (media 65.3 ± 7.8 años).

Esta medida fue necesaria ya que en nuestro laboratorio, se encontraron diferencias según la edad, en los valores de las enzimas que intervienen en la biosíntesis del hemo, como muestra la figura 17. En ella 256 individuos sanos fueron clasificados por su edad, en 4 grupos:

- * GRUPO I; menores de 25 años; n = 63
- * GRUPO II; edad entre 25 - 40 años; n = 69
- * GRUPO III; edad entre 41 - 60 años; n = 72
- * GRUPO IV; mayores de 60 años; n = 60

I. 1. CRITERIOS DE INCLUSION DE DMID Y DMNID.-

Los pacientes fueron diagnosticados de diabetes mellitus, siempre que cumplieren los criterios establecidos por la OMS en 1985, que fueron expuestos ya en este trabajo (pag 38).

El diagnóstico de diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) se estableció cuando se cumplieron simultáneamente dos condiciones:

- * Una edad de comienzo inferior a 35 años
- * Recibir terapia insulínica desde el inicio de la enfermedad

La edad a la que fueron diagnosticados los pacientes incluidos en el grupo de DMID oscilaba entre 1 y 24 años (media 8 ± 5 años). El único paciente diagnosticado a los 24 años, incluido en este grupo, presentaba un valor basal bajo de péptido C (0.1 ng/ml).

El diagnóstico de diabetes mellitus no-insulino-dependiente (DMNID) se estableció ante la presencia simultánea de dos de estos tres criterios:

- * Edad de inicio de la enfermedad superior a 35 años
- * Recibir tratamiento con dieta hipoglucemiante y/o sulfonilureas
- * Inicio de insulino-terapia después de 5 años de tratamiento únicamente con dieta hipoglucemiante y/o sulfonilureas.

Todos tenían una edad diagnóstica superior a 35 años (límites 38-81; $X=54 \pm 9$), excepto ocho pacientes. Dos de ellos, diabéticos a los 15 y 31 años, fueron tratados en los 10 años siguientes y hasta la realización de este trabajo con hipoglucemiantes orales. Un tercero, diagnosticado en 1985 con 15 años de edad, recibía terapia desde ese momento hasta 1991 con dieta hipoglucemiante.

Tres pacientes con 30 y 33 años de edad diagnóstica, necesitaron insulina diez años después. Los dos últimos fueron diabéticos con 31 Y 33 años, requirieron terapia insulínica en ese mismo año, sin embargo se les incluyó en este grupo, por presentar un valor basal normal de péptido C (1.8 ng/ml y 1.4 ng/ml).

El péptido C fue determinado en el laboratorio de Diabetes y Obesidad del Servicio de Medicina Interna III del Hospital Clínico de San Carlos. Su valor basal normal es 0.5 - 3 ng/ml.

Los 99 enfermos de DMNID fueron clasificados en tres grupos según la terapia recibida:

* Grupo I, integrado por 24 pacientes tratados con dieta hipoglucemiante. Edad media 62.4 ± 14.1 años; 9 mujeres y 15 varones.

* Grupo II, compuesto por 28 sujetos que recibían tratamiento con dieta y sulfonilureas (14 glibenclamina, 6 glicacida, 2 gliquidona). Edad media 63.1 ± 10 años; 14 mujeres y 14 varones.

* Grupo III, formado por 47 individuos en terapia con dieta e insulina humana (14 insulina NPH y 18 con una mezcla de insulina NPH e insulina regular). Edad media 61.8 ± 10 años; 36 mujeres y 11 varones.

I. 2. PROTOCOLO DE ESTUDIO.-

Se obtuvo sangre en ayunas de todos los pacientes incluidos en el estudio. Se recogió en tubos con heparina y fue procesada en las primeras 48 horas tras ser mantenidas a 4°C. Se recogió, igualmente, orina.

En la sangre se determinó delta-aminolevulínico-deshidratasa (ALA-D), porfobilinógeno desaminasa (PBG-D) y porfirinas en plasma y hematíes. En orina se valoraron las porfirinas totales.

En el laboratorio de "Obesidad y Diabetes Mellitus" del Servicio de Medicina Interna III, Hospital Clínico de San Carlos, se midió la glucosa en sangre y, por cromatografía, hemoglobina glicosilada (HbA1). La HbA1 se expresa como porcentaje de la hemoglobina total. En individuos sanos, los valores están comprendidos entre 5 - 8 %.

A todos los pacientes incluidos se les realizó una valoración clínica y analítica.

I. 2. 1. VALORACION CLINICA.-

Se reflejó edad, sexo, peso, talla, superficie corporal

$$[\text{Superficie} = \text{Peso} \times \text{Altura} \times 0,024265] \text{ (173) año de diagnóstico de diabetes mellitus, terapia actual, duración y otras terapias recibidas.}$$

Los enfermos diagnosticados de diabetes mellitus insulino-dependiente no sufrían otras enfermedades cuando fueron incluidos en el estudio, por lo que sólo recibían tratamiento antidiabético.

Cuando fueron incluidos en el estudio, 49 pacientes diagnosticados de diabetes mellitus no-insulino-dependiente no padecían otra enfermedad y sólo recibían terapia antidiabética. Los 50 enfermos restantes, diagnosticados de otras enfermedades, recibían diferentes terapias:

- * 36 antihipertensiva (17 antagonistas de los iones Ca^{++} , 15 inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I en angiotensina II (ECA), 4 inhibidor de ECA y antagonista del Ca^{++})

- * 8 Hipolipemiente con bezafibrato.

- * 3 Analgésico con ácido acetil salicílico.

- * 3 Terapia con nitratos.

I. 2. 2. VALORACION ANALITICA.-

Se realizó con datos obtenidos en el Departamento de Análisis Clínicos del Hospital de San Carlos:

* Hematimetría: recuento de glóbulos rojos, valoración de la hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, leucocitos y recuento diferencial, plaquetas.

* bioquímica sanguínea: tasas de las transaminasas séricas glutámico-oxalacética (GOT), glutámico-pirúvica (GPT), gamma-glutamil transferasa (GammaGT), bilirrubina total, lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, colesterol, triglicéridos, urea, ácido úrico, creatinina, sideremia, Zinc y Ferritina.

I. 3. CRITERIOS DE EXCLUSION DEL ESTUDIO.-

Como ya comentamos en la introducción de esta tesis (pag 22-24) las anemias, las enfermedades hepáticas, la insuficiencia renal y la exposición a tóxicos son capaces de alterar la ruta biosintética del hemo o la excreción de las porfirinas. Por todo este motivo, fueron excluidos los pacientes que presentaban:

- 1.- Hemoglobina en sangre inferior a 11,5 g/dl en mujeres y 12 g/dl en varones.
- 2.- Creatinina en suero superior a 1,2 mg/dl y/o urea en suero superior a 55 mg/dl.
- 3.- GOT superior a 40 U/L, GPT superior a 55 U/L, GGT superior a 50 U/L y/o Bilirrubina Total superior a 1,2 mg/dl.

Fue preciso eliminar a 9 pacientes con DMNID para cumplir estos criterios.

II. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.-

Se utilizaron 36 ratas macho de raza Wistar, criadas en el Servicio de Medicina Experimental del Hospital Clínico de San Carlos, con un peso inicial medio de 200 g.

El grupo control (GRUPO A) constituido por 14 animales machos, compartió las mismas condiciones de alojamiento y de alimentación que el grupo tratado. El peso corporal, al concluir el trabajo, se situaba entre 400 g. y 533 g. (media 449 ± 34 g). El peso del hígado estaba comprendido entre 11.09 g. y 19.9 g. (media 13.49 ± 2.11 g).

II. 1. INDUCCION DE DIABETES MELLITUS CON ESTREPTOZOTOCINA.-

Al grupo constituido por 22 ratas, después de una breve anestesia con éter, se les localizó el latido de la punta cardíaco, donde se inyectó una sola dosis de estreptozotocina (65 mg/kg de peso) disuelta en suero fisiológico. El fármaco fue adquirido del laboratorio Sigma (Alcobendas, Madrid). Los animales fueron sacrificados a los tres meses.

Un grupo de 11 ratas (GRUPO B), al presentar una glucemia entre 200 y 250 mg/dl, no fueron consideradas diabéticas. Este grupo presentaba un peso corporal final comprendido entre 350 y 561 g (media 411 ± 78 g) y un peso hepático entre 9.62 y 17.9 g (media 14.39 ± 2.75 g).

Los restantes 11 animales (GRUPO C), con una glucemia superior a 250 mg/dl, fueron consideradas diabéticas, siguiendo los criterios utilizados en la bibliografía a nuestro alcance (157, 174, 175). Su peso corporal final se encontraba entre 220 y 531 g (media 326 ± 90 g) y el peso hepático se situaba entre 9.93 y 17.66 g (media 12.44 ± 2.4 g).

II. 2. OBTENCION Y PREPARACION DE MUESTRAS.-

Los animales fueron sacrificados por decapitación, transcurridas 18 horas de ayuno; a continuación se realizó una incisión a lo largo de la línea media ventral para obtener sangre intracardiaca y de la vena porta. Llegado este momento se procedió a la extracción del hígado.

La sangre se recogió en tubos con heparina y fue procesada en las primeras 48 horas. El hígado, después de ser pesado, se mantuvo siempre en hielo, fue lavado con CIK 1.15% y se realizó un homogeneizado 1:4 con CIK 1.15%.

El homogeneizado se centrifugó a 12.000 g. durante 20 minutos y a 4°C; se obtuvo así la fracción denominada "sobrenadante postmitocondrial" que contiene el citosol y los microsomas. En esta fracción se determinaron las enzimas ALA-D y PBG-D, así mismo se determinaron las porfirinas tisulares. El sobrenadante se conservó a - 40°C para preservar la actividad enzimática y se manipuló lo menos posible.

III. DETERMINACIONES ENZIMATICAS.-

En pacientes diagnosticados de diabetes mellitus se valoraron las enzimas ALA-D y PBG-D en eritrocitos.

En los animales de experimentación se midieron ambas enzimas en eritrocitos y en tejido hepático.

III. 1. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALA-D ERITROCITARIA.-

Se valoró utilizando dos técnicas diferentes, el método estandarizado europeo (175) y el de Fujita y cols (177).

El método estandarizado europeo consiste en hemolizar 0,2 ml de sangre total heparinizada con 1,3 ml de agua destilada. Al hemolizado se le añade 1 ml de una solución tampón fosfato ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 0,1 M, ajustado a pH 6,8 con NaH_2PO_4 0,1 M), que contiene ALA en una concentración 10 mM; se incuba posteriormente a 37°C durante una hora.

Después de la incubación, la reacción se detiene añadiendo a las muestras 1 ml de la solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (V/V). Las proteínas se eliminan por precipitación tras ser centrifugadas a 1670 g. durante 15 minutos.

La valoración del producto formado, porfobilinógeno (PBG), se realiza por el uso del reactivo de Ehrlich, que contiene p-dimetil-amino-benzaldehido, compuesto que reacciona con el PBG y forma un complejo coloreado. El complejo es valorado con el espectrofotómetro, a una longitud de onda de absorción de 553 nm, con un coeficiente de extinción molar de 62 $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, aplicando la fórmula:

$\frac{\mu\text{M de ALA consumidos}}{\text{min / L Hties}} = \frac{D553 \times 100}{\text{Hto}} \times \frac{V_f}{V_i} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{0,062} \times 2$
--

En esta fórmula el valor D553 es la absorbencia de la muestra; 60 es el tiempo de incubación expresado en minutos; V_f y V_i son los volúmenes final e inicial de la muestra, respectivamente; 0,062 es el coeficiente de extinción molar, expresado en μMoles ; Hto es el valor del hematocrito de la muestra.

Para obtener una molécula de PBG es necesaria la condensación enzimática de dos moléculas de ALA, por lo que al multiplicar por 2 el resultado, obtendremos la cantidad de ALA usada como sustrato.

La actividad de la ALA-D eritrocitaria obtenida por el método estandarizado europeo, no refleja la actividad de la totalidad de la enzima presente en los hematíes. Es por este motivo por lo que Fujita y cols (177) desarrollaron un método en el que la actividad de la ALA-D medida presenta una buena correlación con la cantidad total de la enzima presente en los eritrocitos ($r=0.876$), valorada por RIA.

El método de Fujita y cols permite que la formación de PBG se realice en un ambiente rico en agentes reductores (DTT) y en iones metálicos (Zn), lo que facilita un rendimiento óptimo de la enzima sulfhídrica ALA-D. Así se puede evitar el efecto inhibitorio que sobre la enzima ejerce el plomo (178) y otros metales pesados (179).

El método de Fujita y cols se denomina: "actividad de la ALA-D restaurada o activada".

La hemólisis de la muestra, 0,2 ml de sangre total, se realiza con 1,3 ml de agua destilada que contiene ditioneol (DTT) 10 mM y SO_4Zn 100 μM .

El hemolizado se preincuba a 37°C, durante 10 minutos. A continuación se añade 1 ml de solución tampón fosfato sódico 0,1 M ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 0,1 M ajustado a pH 6,8 con NaPO_4H_2 0,1 M) que contiene ALA en una concentración 10 mM. Se incuba una hora a 37°C.

La reacción se detiene con 1 ml de solución acuosa de TCA al 10 % (V/V) que contiene HgCl_2 0,5 mM y se centrifugan las muestras 15 minutos a 2000 g. para separar las proteínas.

La valoración del producto formado, PBG, se realiza por el uso del reactivo de Ehrlich modificado con la adición de HgCl_2 10⁻² mM en ácido acético glacial, para formar un complejo coloreado que se mide con el

espectrofotómetro, de manera similar a la descrita en el método estandarizado europeo. Se aplicará la misma fórmula.

III. 2. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALA-D HEPATICA.-

Se determina en 0,3 ml de sobrenadante postmitocondrial y se siguen los dos métodos, estandarizado europeo (176) y el de Fujita y cols (177) utilizados para valorar la enzima en los eritrocitos.

La actividad de la enzima se expresa en nmol de PBG formados en una hora, por mg de proteína.

nmol PBG formado		Vf	1	1	1
----- =	D553 x	-- x	--	x -- x	-----
min / mg prot		Vi	60	0,062	mg prot

En esta fórmula, el valor D553 es la absorbencia de la muestra; 60 es el tiempo de incubación expresado en minutos; Vf y Vi son los volúmenes final e inicial de la muestra, respectivamente; 0,062 es el coeficiente de extinción molar de PBG, expresado en μ Moles.

III. 3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PBG-D ERITROCITARIA.-

Se determina por el método fluorimétrico de Anderson y Desnik (180).

Se añade a 0,2 ml de sangre total heparinizada, 0,8 ml de tampón de hemólisis, que contiene una solución tampón fosfato ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 0,1 M, ajustado a pH 7,6 con NaH_2PO_4 0,1 M) con ditioneitol (DTT) 1 mM, Cl_2Hg 1mM y tritón X-100 0,05% (V/V).

Se toman del hemolizado anterior, 0,1 ml que se mezclan con 0,8 ml de tampón de incubación, constituido por buffer Tris-HCl 0,1 M, que se ajusta a pH 8,1 y DTT 0,1 mM. Se ensaya de forma paralela con un blanco sin muestra.

A continuación se preincuba 3 minutos a 37°C y se añade el substrato, 0,5 ml de buffer PBG, formado por buffer de incubación con PBG 1mM. Se procede a incubar en oscuridad durante una hora a 37°C.

Después de la incubación se exponen los muestras 20 minutos a la luz ultravioleta para oxidar los porfirinógenos a porfirinas y se separan las proteínas al centrifugar las muestras 15 minutos a 2000 g.

El sobrenadante se valora con el fluorímetro a una longitud de onda de 405 nm de excitación y 595 de emisión, frente a un estándar de coproporfirina disuelta en HCL 1,5 N, con una concentración de 50 µg/l (Porphyrin Products. Utah USA).

La actividad de la enzima PBG-D se calcula por el número de nmol de uroporfirinógeno formados en una hora, por ml de hematíes, se utiliza la fórmula:

$\frac{\text{nmol de URO}}{\text{ml. Hties. / Hora}} = \frac{\text{F. muestra}}{\text{F. estándar}} \times \frac{V_f}{V_i} \times \frac{100}{\text{Hto}} \times \frac{1}{\text{PM}} \times \text{Con.Est}$
--

En esta fórmula "F. muestra" y "estándar" representan la lectura fluorimétrica de la muestra y de la solución patrón de coproporfirina en HCl 1,5 N (50 µg/l; P/V); Vf y Vi corresponden al volumen final e inicial de la muestra; Hto el valor hemotocrito de la muestra; "Conc.Est" es la concentración de la solución patrón de coproporfirina (50 µg/l) y PM es el peso molecular de la coproporfirina (654,73).

III. 4. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PBG-D HEPATICA.-

Se determina en 0,5 ml de sobrenadante postmitocondrial, por el método de Anderson y Desnick (180), ya empleado en los eritrocitos.

La actividad de la enzima se valora por el número de nmol de uroporfirinógeno formado en una hora, por mg de proteína; se aplica la fórmula:

$\frac{\text{nmol de Uro}}{\text{Hora / mg. prot}} = \frac{\text{F.muestra}}{\text{F.estándar}} \times \frac{V_f}{V_i} \times \frac{1}{\text{PM}} \times \frac{1}{\text{mg.prot}} \times \text{C.Est}$
--

En ella "F. muestra" y "estándar" se refiere a la lectura fluorimétrica de la muestra y de la solución de coproporfirina estándar (50 $\mu\text{g/l}$; V/V); V_f y V_i corresponde al volumen inicial y final de la muestra; "C.Est" es la concentración de la solución patrón de coproporfirina (50 $\mu\text{g/l}$) y PM es el peso molecular de la coproporfirina (654,73).

IV. DETERMINACION DE PORFIRINAS EN PLASMA Y HEMATIES.-

Se cuantificaron por el método fluorimétrico descrito por Piomelli (181). Según ese método, la muestra está constituida por 0,1 ml de plasma o de hematíes, a los que se añade 0,3 ml de una solución tampón fosfato (PBS) (Na_2HPO_4 10 mM ajustado a pH 7,4 con NaH_2PO_4 10 mM + NaCl al 0,9 % ; P/V).

Las porfirinas se extraen con 2 ml de acetato de etilo/ácido acético (4/1; V/V), se agita energicamente y se centrifuga 5 minutos a 420 g.

A continuación se separa el sobrenadante y se le añade 2 ml de HCl 1,5 N, para la extracción de las porfirinas presentes en la muestra. Estas quedan localizadas en la fase inferior o clorhídrica del tubo de ensayo, cuyo volumen se anota.

La fase inferior se lee en el fluorímetro frente a una solución estándar de coproporfirina disuelta en HCL 1,5 N saturado con acetato de etilo/ácido acético (4/1; V/V), con una concentración de 50 $\mu\text{g/l}$ (Porphyrin Products INC. Utah USA).

La longitud de onda de emisión del fluorímetro se ajustó a 595 nm y la de excitación a 405 nm.

La cantidad de porfirinas presentes en la muestra, se calcula aplicando la fórmula:

$\frac{\mu\text{g porfirina}}{\text{dl}} = \frac{\text{F. muestra}}{\text{F. estándar}} \times \frac{V_f}{V_i} \times \text{Conc Estándar} \times F_c$
--

Donde "F. muestra y estándar" corresponden a la lectura fluorimétrica de la muestra y de la solución de coproporfirina estándar (50 $\mu\text{g/l}$); V_i y V_f son los volúmenes inicial y final de la muestra. F_c representa el factor de corrección utilizado para expresar el resultado en μg de UROporfirina/dl de plasma y en μg de PROTOporfirina/dl de hematíes, que toma los valores de 1 y 5,27733 respectivamente. "Conc estandar" es la concentración de la solución patrón de coproporfirina, expresada en $\mu\text{g/dl}$.

V. DETERMINACION DE PORFIRINAS EN ORINA.-

Se han determinado siguiendo el método de Westerlund y cols (182).

La muestra está constituida por 0,1 ml de orina, a la que se añade 1 ml de HCL 3 N y una gota de iodo, para oxidar los porfirinógenos y convertirlos en porfirinas; después se decolora con 3 ml de tiosulfato sódico 0,45 mM.

El contenido total de porfirinas se valora con el fluorímetro, a 405 nm de longitud de onda de excitación y 650 nm de emisión, frente a un blanco y una solución estándar de coproporfirina en tiosulfato sódico.

Las porfirinas urinarias se expresan en $\mu\text{g/L}$ y su valor se obtiene aplicando la fórmula:

$\mu\text{g/L} =$	$\frac{\text{F. muestra}}{\text{F. estándar}} \times$	$\frac{V_f}{V_i}$	$\times \text{Conc. Estándar}$
-------------------	---	-------------------	--------------------------------

Donde "F. estandar" y "F. muestra" corresponden a la lectura fluorimétrica de la muestra y de la solución de coproporfirina estándar; V_f y V_i son los volúmenes final e inicial de la muestra, respectivamente; "Conc estandar" representa la concentración de la solución patrón de coproporfirina, expresada en $\mu\text{g/l}$.

VI. DETERMINACION DE PORFIRINAS EN TEJIDO HEPATICO.-

Las porfirinas hepáticas se determinaron por el método de Grandchamp (183).

Se realiza una dilución 1/10 (V/V) del sobrenadante postmitocondrial en metanol/ácido perclórico 1 N, 1:1 (V/V).

El sobrenadante obtenido por agitación y posterior centrifugación durante 15 minutos a 1670 g., se valora con el fluorímetro.

La concentración de porfirinas se obtiene al comparar la muestra con un patrón de coproporfirina III; 100 nM, en metanol / perclórico. Las longitudes de onda de excitación y de emisión empleadas son:

	EXCITACION	EMISION
Coproporfirina	402 nm	595 nm
Uroporfirina	406 nm	595 nm
Protoporfirina	410 nm	605 nm

$\frac{\text{ng de porfirinas}}{\text{g. tejido}} = \frac{\text{F. muestra}}{\text{F. estándar}} \times \frac{V_f}{V_i} \times \text{Conc. Estándar}$

En esta fórmula "F. estándar y muestra" representan la lectura fluorimétrica de la muestra y de la solución de coproporfirina estándar; Vi y Vf los volúmenes inicial y final de la muestra respectivamente; "conc estándar" corresponde a la concentración de la solución patrón de coproporfirina, expresada en $\mu\text{g/l}$.

Se determina la concentración de proteínas en el homogeneizado y el resultado se expresa en ng porfirina / g. de tejido.

VII. DETERMINACION DE PROTEINAS EN TEJIDO HEPATICO.-

La concentración de proteínas se valoró siguiendo el método de Lowry (184).

Se toma 1 ml del homogeneizado, se le añade 5 ml de una solución que contiene: 50 ml de sulfato sódico al 2% en hidróxido sódico 0,1 M, 0,5 ml de sulfato de cobre al 1% y 0,5 ml de fosfato sódico al 2%.

Transcurridos 15 minutos se le añade 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 en agua. Se deja reposar 30 minutos y se mide la absorbencia con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. La concentración de proteínas se cuantifica a partir de la absorbencia, empleando una curva de calibración de albúmina de suero bovino, preparada para cada batería de análisis.

VIII. METODOS ESTADISTICOS.-

Los parámetros utilizados fueron las medidas de centralización y dispersión habituales: media y desviación estándar. La distribución de las variables se ajustaba a la ley normal, por ello se utilizaron métodos paramétricos.

La comparación de las medias de dos variables cuantitativas, se realizó con el test de la "t" de Student (185).

Cuando se trataba de más de dos series de valores, se utilizó el análisis de la varianza para un factor (ANOVA), con esta prueba se consigue un mayor rigor matemático que la realización de sucesivas pruebas "t" de Student. Cuando el análisis de la varianza fue significativo, se utilizó el método de Newman y Keuls para comparar las medias por parejas y conocer en que grupo o grupos las diferencias eran significativas.

En el caso de analizar más de dos series de valores que no se ajustaban a una distribución normal, se utilizó el test de Kruskal and Wellis (K-W o U-test) (186), ya que en este caso no es posible utilizar el test de análisis de la varianza, óptimo para una distribución normal.

La existencia o no de dependencia entre dos variables, se realizó por cálculo del coeficiente de correlación lineal "r".

La hipótesis nula se rechazó cuando se alcanzaron niveles de significación de "p" inferiores al 5%.

RESULTADOS

En este capítulo se recogen los valores analíticos del metabolismo porfirínico de los pacientes con DM incluidos en este estudio, los dos grupos controles igualmente incluidos y los valores de referencia para la población normal que procede, tanto del laboratorio central del Hospital Clínico de San Carlos, como del laboratorio de "Obesidad y Diabetes Mellitus" del Servicio de Medicina Interna IV de este Hospital. Estos resultados se muestran divididos en dos secciones diferentes.

En la primera sección (Tablas I a XVII) se recogen los datos de los 32 pacientes con DMID y su grupo control.

En la segunda sección (Tablas XVIII a XLIV) se muestra los resultados de los 99 pacientes con DMNID y su grupo control.

Existe una tercera sección que abarca desde la tabla XLV a la tabla L, en ella se muestra los valores analíticos individuales del metabolismo porfirínico encontrados en dos grupos de ratas a las que se administró STZ (diabéticas e inyectadas no diabéticas), así como los resultados obtenidos en el grupo de ratas control.

Al final de esta sección se indican las correlaciones significativas encontradas en los pacientes con DMID, con DMNID y en los animales de experimentación.

En cada una de las tablas se indica el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, con indicación de la prueba estadística empleada, el valor medio (\bar{X}) más/menos la desviación estándar (D.E.) y el grado de significación estadística.

TABLA I. Valores de referencia de Hematimetría y abreviaturas utilizadas.-

PARAMETRO	VALORES NORMALES	UNIDADES	ABREVIATURAS
HEMATIES	M = 4,2-5,4 V = 4,7-5,1	$\times 10^6$	G.R.
HEMOGLOBINA	M = 12-16 V = 14-18	g/dl	Hb
HEMATOCRITO	M = 37-47 V = 42-52	%	Hct
VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO	M = 81-99 V = 80-94	fl	VCM
HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA	27 - 31	pg	HCM
CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA	33 - 36	g/dl	CHCM
LEUCOCITOS	4,8 - 10,8	$\times 10^3$	Leuc
NEUTROFILOS	42,2 - 75,2	%	Neutr
LINFOCITOS	20,5 - 51,5	%	Linfo
PLAQUETAS	150 - 450	$\times 10^3$	Plaq

TABLA II. Valores de referencia en bioquímica sanguínea y abreviaturas utilizadas.

PARAMETROS	VALORES NORMALES	UNIDADES	ABREVIATURAS
GLUCOSA	65 - 110	mg/dl	Gluc
UREA	15 - 50	mg/dl	Urea
CREATININA	0,5 - 1,2	mg/dl	Cr
Ac. URICO	2,6 - 7,0	mg/dl	Ac.Ur.
BILIRRUBINA TOTAL	0,2 - 1,2	mg/dl	BT
COLESTEROL TOTAL	140 - 200	mg/dl	Col
TRIGLICERIDOS	45 - 150	mg/dl	TG
FOSFATASA ALCALINA	35 - 125	U/L	F. Alc
TRANSAMINASA GLUTAMICO-PIRUVICA	5 - 55	U/L	GPT
TRANSAMINASA GLUTAMICO-OXALACETICA	5 - 40	U/L	GOT
TRANSFERASA GAMMAGLUTAMIL	5 - 37	U/L	gammaGT
LACTICO DESHIDROGENASA	60 - 225	U/L	LDH
SIDEREMIA	60 - 160	µg/dl	Fe
ZINCEMIA	70 - 120	µg/dl	Zn
FERRITINA	H = 10-200 V = 20-250	ng/ml	Ferr
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	5 - 8	%	HbA1

TABLA III. Hematimetría y bioquímica sérica de 32 pacientes con DMID.

HEMATIMETRIA		BIOQUIMICA SERICA	
PARAMETRO	X ± D.E.	PARAMETRO	X ± D.E.
G.R.	4,77 ± 0,37	Gluc	216 ± 95
Hgb	13,9 ± 1,01	Urea	36,1 ± 9,6
Hct	40,79 ± 3,2	Cr	0,78 ± 0,20
VCM	85,03 ± 5,2	Ac. Ur.	3,47 ± 1,23
HCM	29,25 ± 1,98	B.T.	0,71 ± 0,29
CHCM	34,26 ± 1,06	F.Alc.	248 ± 182
Leuc	7,09 ± 2,47	GPT	19,31 ± 8,16
Neutr	47 ± 14	GOT	17,21 ± 6,04
Linfo	43 ± 13	LDH	166 ± 35
Plaq	266 ± 72	HbA1	9,06 ± 2,21

TABLA IV. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo en los 32 pacientes con DMID.

Nº	ALA-D μMoles ALA/ L.Hte./min	ALA-D Act μMoles ALA/ L.Hte./min	PBG-D nMoles URO/ ml.Hte/Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
1	21,11	43,3	42,5	2,05
2	20,6	54,2	32,29	2,63
3	25,11	51,7	46,93	2,05
4	29,33	45,11	44,37	1,53
5	38,18	62,23	31	1,62
6	16,27	50,51	41,16	3,10
7	28,8	46,18	56,1	1,60
8	30,74	44,36	52,39	1,44
9	29,56	39,77	46,05	1,34
10	31,78	44,4	43,16	1,39
11	33,84	46,53	49,05	1,37
12	31	44,62	36,58	1,43
13	20,23	29,83	40,78	1,47
14	24,11	48,67	41,4	2,01
15	22,75	33,64	43,52	1,47
16	37,79	39,35	34,24	1,04
17	29,71	32,92	37,5	1,10
18	20,05	28,47	46,57	1,42
19	12,81	28,26	38,58	2,20
20	32,13	61,95	38,68	1,92
21	22,2	25,83	45,58	1,16
22	18,7	21,76	44,3	1,16
23	33,8	76,2	23,21	2,25
24	36,48	44,12	27,95	1,20
25	26,1	40,57	27,16	1,55
26	22,88	33,6	31,69	1,46
27	28,32	36,86	35,59	1,30
28	26,28	46,29	35,66	1,76
29	36,3	44,2	36,81	1,21
30	32,47	47,88	33,58	1,47
31	37,52	51,06	36,22	1,36
32	31,29	46,18	46,4	1,47

TABLA V. Porphirinas en hematíes, plasma y orina en los 32 pacientes con DMID.

Nº	HEMATIES $\mu\text{g/dL}$	PLASMA $\mu\text{g/dl}$	ORINA $\mu\text{g/L}$
1	35,47	0,75	140,9
2	40,16	0,4	287
3	16,28	0,32	120,5
4	9,93	0,145	199,5
5	5,06	0,286	199,5
6	13,8	0,421	71,7
7	11,3	0,344	113,5
8	20,2	0,302	40,2
9	14,98	0,163	44,7
10	10,65	0,216	86,1
11	11,23	0,178	113,6
12	31,32	0,478	26,1
13	28,24	0,237	37,6
14	30,91	0,265	50,7
15	58,72	0,246	55,7
16	46,48	0,331	27,3
17	33,1	0,213	83,3
18	33	0,286	87,9
19	31,7	0,471	50,7
20	28,24	0,23	69,3
21	14,29	0,24	125
22	23,41	0,322	57,4
23	7,43	0,348	166,6
24	10,77	0,216	45,7
25	11,97	0,265	131,6
26	11,44	0,517	64,02
27	23,91	0,562	78,2
28	19,8	0,456	30,8
29	11,32	0,354	121,7
30	15,94	0,574	51,02
31	27,49	0,208	84,9
32	47,32	0,7	58,15

TABLA VI. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm$ D.E.) en pacientes con DMID y en el grupo control.

GRUPO	ALA-D μ Mol.ALA/ L.GR./min	ALA-D Act μ Mol. ALA/ L.GR./min	PBG-D nMol. URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
CONTROL n= 20	41,3 \pm 7,3	66,5 \pm 8,6	27,1 \pm 4,4	1,6 \pm 0,3
DMID n= 32	*** 27.7 \pm 6.6	*** 43.4 \pm 11	*** 39.5 \pm 7.4	1.6 \pm 0.4

*** p < 0.001 v.s. Control (Test "t" de Student).

TABLA VII. 1. Glucemia y HBA1 en enfermos de DMID ($X \pm$ D.E.) clasificados por el percentil 50 de edad.

GRUPOS DE EDAD EN DMID (años)	GLUCEMIA mg / dl	HBA1 %
\leq 13 años n= 14	175,7 \pm 107,2	7,80 \pm 1,40
> 13 años n= 18	* 247,5 \pm 74,74	** 10,03 \pm 2,26

** p < 0,01; * p < 0,05 v.s. Grupo \leq 13 años de edad. (Test "t" de Student)

TABLA VII. 2. Glucemia y HBA1 en enfermos de DMID ($X \pm$ D.E.) clasificados por el percentil 50 del tiempo del evolucion.

GRUPOS DE EVOLUCION DMID (años)	GLUCEMIA mg / dl	HBA1 %
$\leq 7,4$ años n= 16	197,1 \pm 102,9	8,26 \pm 1,92
$> 7,4$ años n= 16	235,1 \pm 87,35	* 9,86 \pm 2,24

* $p < 0,05$ v.s. Grupo $\leq 7,4$ años de Evolución. (Test "t" de Student)

TABLA VII. 3. Glucemia y HBA1 en enfermos de DMID ($X \pm$ D.E.) clasificados por el percentil 50 de su superficie corporal.

GRUPOS POR SUPERFICIE CORPORAL m ² DMID	GLUCEMIA mg / dl	HBA1 %
$\leq 1,44$ m ² n= 16	189,0 \pm 107,8	8,21 \pm 2,07
$> 1,44$ m ² n= 16	243,2 \pm 76,17	* 9,90 \pm 2,08

* $p < 0,05$ v.s. Grupo $\leq 1,44$ m de superficie corporal (Test "t" de Student)

TABLA VII. 4. Glucemia y HBA1 en enfermos de DMID ($X \pm$ D.E.) clasificados según su sexo.

GRUPOS SEGUN EL SEXO DMID	GLUCEMIA mg / dl	HBA1 %
VARONES n= 16	209,2 \pm 93,1	8,82 \pm 2,27
MUJERES n= 16	223,0 \pm 101,0	9,30 \pm 2,20

No se aprecian diferencias entre ambos grupos (Test "t" de Student)

TABLA VIII. 1. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm$ D.E.) en pacientes con DMID clasificados según el percentil 50 de su edad, en el momento del estudio.

GRUPOS DE EDAD EN DMID (años)	ALA-D μ Mol ALA/ L.GR./min	ALA-D Act μ Mol ALA/ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
\leq 13 años n= 14	29,4 \pm 5,4	42,1 \pm 9,6	40,0 \pm 7,47	1,4 \pm 0,26
> 13 años n= 18	26,4 \pm 7,3	44,4 \pm 12	39,2 \pm 7,61	* 1,7 \pm 0,53

* $p < 0,05$ v.s. Grupo \leq 13 años (Test "t" de Student).

TABLA VIII. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm$ D.E.) en pacientes con DMID clasificados por el percentil 50 del tiempo de evolucion.

GRUPOS EVOLUCION DMID (años)	ALA-D μ Mol ALA/ L.GR./min	ALA-D Act μ Mol ALA/ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
$\leq 7,4$ n= 16	29,9 \pm 5,6	45,3 \pm 13	38,8 \pm 8,6	1,5 \pm 0,34
> 7,4 n= 16	@ 25,5 \pm 7,0	41,5 \pm 8,9	40,3 \pm 6,2	1,7 \pm 0,54

@ $p < 0,1$ v.s. Grupo $\leq 7,4$ años (Test "t" de student)

TABLA VIII. 3. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm$ D.E.) en pacientes con DMID clasificados según el percentil 50 su serficie corporal.

GRUPOS SUPERFICIE CORPORAL DMID (m2)	ALA-D μ Mol ALA/ L.GR./min	ALA-D Act μ Mol ALA/ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
$\leq 1,44$ m2 n= 16	28,0 \pm 6,7	44,7 \pm 12	38,1 \pm 7,17	1,6 \pm 0,43
> 1,44 m2 n= 16	27,5 \pm 6,8	42,1 \pm 10	40,9 \pm 7,68	1,5 \pm 0,49

No existen diferencias significativas entre grupos (Test "t" de Student).

TABLA VIII. 4. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en enfermos con DMID, clasificados según su sexo.

GRUPOS SEGUN EL SEXO DMID	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
VARONES n=16	28,6 \pm 7,1	40,7 \pm 9,5	39,2 \pm 6,9	1,4 \pm 0,30
MUJERES n=16	26,8 \pm 6,2	46,1 \pm 12	39,9 \pm 8,1	@ 1,7 \pm 0,53

@ $p < 0,1$ v.s. Grupo de varones (Test "t" de Student)

TABLA IX. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en pacientes con DMID clasificados por los cuartiles de su glucemia.

GRUPOS SEGUN LA GLUCEMIA DMID	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
< 127 n= 8	30,6 \pm 5,4	44,4 \pm 14	36,8 \pm 10	1,4 \pm 0,35
127-221 n= 8	27,9 \pm 6,2	44,3 \pm 10	38,3 \pm 5,20	1,6 \pm 0,53
222-285 n= 8	27,2 \pm 7,5	43,1 \pm 13	41,3 \pm 5,3	1,5 \pm 0,31
> 285 n=8	25,1 \pm 7,3	41,9 \pm 7,5	41,8 \pm 8,0	1,7 \pm 0,60

No encontramos diferencias significativas entre los cuatro grupos (Test de Kruskal-Wallis).

Tabla IX. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en pacientes con DMID clasificados por el percentil 50 de su glucemia.

GRUPOS SEGUN LA GLUCEMIA DMID	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/\text{L.GR.}/\text{min}$	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/\text{L.GR.}/\text{min}$	PBG-D $\text{nMol URO}/\text{ml.GR.}/\text{Hora}$	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 220 n= 16	$29,3 \pm 5,8$	$44,3 \pm 12$	$37,5 \pm 7,8$	$1,5 \pm 0,44$
> 220 n= 16	$26,2 \pm 7,2$	$42,5 \pm 10$	$41,5 \pm 6,6$	$1,6 \pm 0,47$

No encontramos diferencias significativas entre los ambos grupos (Test "t" de Student).

TABLA X. 1. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en pacientes con DMID clasificados por los cuartiles de su hemoglobina glicosilada.

GRUPOS SEGUN LA HBA1 EN DMID	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/\text{L.GR.}/\text{min}$	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/\text{L.GR.}/\text{min}$	PBG-D $\text{nMol URO}/\text{ml.GR.}/\text{Hora}$	ALA-D Act ----- ALA-D
$< 7,5 \%$ n= 9	$32,2 \pm 3,4$	$48,7 \pm 12$	$37,2 \pm 9,1$	$1,5 \pm 0,3$
$7,5-9,15\%$ n=7	$26,6 \pm 5,9$	$36,8 \pm 8,8$	$38,1 \pm 6,8$	$1,4 \pm 0,3$
$9,16-10,5\%$ n= 8	$29,3 \pm 6,8$	$45,1 \pm 9,5$	$39,3 \pm 5,8$	$1,5 \pm 0,2$
$> 10,5\%$ n=8	* $22,0 \pm 6,2$	$41,5 \pm 12$	$43,6 \pm 6,9$	@ $1,9 \pm 0,6$

@ $p < 0,1$; * $p < 0,05$ v.s. Grupo HBA1 $< 7,5 \%$ (Test de Kruskal-Wallis)

TABLA X. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm$ D.E.) en pacientes con DMID clasificados por el percentil 50 de su hemoglobina glicosilada.

GRUPOS SEGUN LA HBA1 EN DMID	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ $\text{L.GR.}/\text{min}$	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ $\text{L.GR.}/\text{min}$	PBG-D $\text{nMol URO}/$ $\text{ml.GR.}/\text{Hora}$	ALA-D Act ----- ALA-D
$\leq 9,14\%$ n=16	$29,8 \pm 5,3$	$43,5 \pm 12$	$37,6 \pm 7,9$	$1,4 \pm 0,33$
$> 9,14\%$ n= 16	@ <u>$25,6 \pm 7,3$</u>	$43,3 \pm 10$	$41,5 \pm 6,5$	@ <u>$1,7 \pm 0,52$</u>

@ $p < 0,1$ v.s. Grupo HBA1 $\leq 9,14\%$ (Test "t" de Student)

TABLA XI. Porphirinas en plasma, hematíes y orina en enfermos de DMID y en el grupo control ($X \pm$ D.E.).

GRUPO	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
CONTROL n= 20	24.68 ± 12.1	0.32 ± 0.39	78.53 ± 43.7
DMID n= 32	22.99 ± 13.1	0.34 ± 0.15	91.31 ± 58.8

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (Test "t" de Student).

TABLA XII. 1. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.) en enfermos de DMID clasificados según los cuartiles de la edad.

GRUPOS DE EDAD EN DMID(años)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
< 12 años n= 6	23,1 \pm 10,3	0,32 \pm 0,16	56,48 \pm 24
12 - 13 n= 8	18,4 \pm 5,79	0,26 \pm 0,05	83,88 \pm 34
14 - 16 n= 9	26,8 \pm 7,43	0,37 \pm 0,12	70,69 \pm 46
> 16 años n= 9	22,97 \pm 15	0,39 \pm 0,20	* 141,76 \pm 74

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ v.s. Grupo < 12,5 años (Test de Kruskal-Wallis)

TABLA XII. 2. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.) en enfermos de DMID clasificados según el percentil 50 de la edad.

GRUPOS DE EDAD EN DMID (años)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
\leq 13 años n= 14	20,5 \pm 9,17	0,29 \pm 0,11	72,1 \pm 32
> 13 años n= 18	24,9 \pm 15,6	@ 0,38 \pm 0,16	@ 106,2 \pm 70

@ $p < 0,1$ v.s. Grupo \leq 13 años (Test "t" de Student).

TABLA XIII. 1. Porfirinas en plasma, hematíes y orina en enfermos de DMID ($X \pm D.E.$) clasificados por los cuartiles del tiempo de evolución.

GRUPOS DE EVOLUCION DMID (años)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
< 3 años n = 9	20,3 \pm 13	* 0,24 \pm 0,07	97,9 \pm 59
3 - 7,5 n = 7	19,9 \pm 10	0,32 \pm 0,10	80,5 \pm 61
7,6 - 9 n = 9	24,6 \pm 14	* 0,32 \pm 0,14	76,8 \pm 31
> 9 años n = 7	27,3 \pm 14	0,51 \pm 0,14	112,3 \pm 83

* $p < 0,05$ v.s. Grupo > 9 años de Evolución (Test de Kruskal-Wallis)

TABLA XIII. 2. Porfirinas en plasma, hematíes y orina en enfermos de DMID ($X \pm D.E.$) clasificados por el percentil 50 del tiempo de evolución.

GRUPOS DE EVOLUCION DMID (años)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
$\leq 7,4$ n = 16	20,2 \pm 11,5	0,28 \pm 0,09	90,2 \pm 59
> 7,4 n = 16	25,7 \pm 14,4	* 0,40 \pm 0,17	92,3 \pm 60

* $p < 0,05$ v.s. Grupo $\leq 7,4$ años de Evolución (Test "t" de Student)

TABLA XIV. 1. Porfirinas en plasma, hematíes y orina en enfermos de DMID ($X \pm D.E.$) clasificados por los cuartiles de la superficie corporal.

GRUPOS SUPERFICIE CORPORAL DMID (m ²)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
< 1,04 n= 8	22,0 \pm 10	0,27 \pm 0,10	68,3 \pm 31
1,04 -1,44 n= 8	23,9 \pm 10	0,37 \pm 0,12	91,6 \pm 90
1,45 -1,61 n= 8	18,3 \pm 12	0,38 \pm 0,16	91,3 \pm 31
> 1,61 n= 8	27,6 \pm 18	0,34 \pm 0,20	113,9 \pm 63

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Test de Kruskal-Wallis)

TABLA XIV. 2. Porfirinas en plasma, hematíes y orina en enfermos de DMID ($X \pm D.E.$) clasificados por el percentil 50 de su superficie corporal.

GRUPOS SUPERFICIE CORPORAL DMID (m ²)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
\leq 1,44 n= 16	22,9 \pm 10	0,32 \pm 0,11	80,0 \pm 66
> 1,44 n= 16	23,0 \pm 15	0,36 \pm 0,17	102,6 \pm 49

No existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Test "t" de Student).

TABLA XV. Porfirinas en plasma, hematíes y orina en enfermos de DMID ($X \pm D.E.$) clasificados según el sexo.

GRUPOS SEGUN EL SEXO DMID	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
VARONES n=16	23,5 \pm 14,5	0,31 \pm 0,17	83,88 \pm 45
MUJERES n=16	22,4 \pm 12,1	0,37 \pm 0,17	98,74 \pm 70

No existen diferencias significativas entre ambos grupos (Test "t" de Student).

TABLA XVI. Porfirinas en plasma, hematíes y orina en enfermos de DMID ($X \pm D.E.$) clasificados por el percentil 50 de su glucemia.

GRUPOS SEGUN LA GLUCEMIA DMID (mg/dl)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
≤ 220 n= 16	22,05 \pm 12,44	0,33 \pm 0,16	108,87 \pm 67
> 220 n= 16	23,93 \pm 14,24	0,35 \pm 0,14	[@] 73,76 \pm 44

@ $p < 0,1$ v.s. Grupo ≤ 220 mg/dl (Test "t" de Student)

TABLA XVII. Porfirinas en plasma, hematías y orina en enfermos de DMID ($X \pm D.E.$) clasificados por el percentil 50 de la hemoglobina glicosilada.

GRUPOS SEGUN LA HBA1 EN DMID	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
$\leq 9,14 \%$ n= 16	$20,75 \pm 11,44$	$0,31 \pm 0,11$	$76,36 \pm 41$
$> 9,14 \%$ n= 16	$25,23 \pm 14,76$	$0,37 \pm 0,17$	$106,86 \pm 70$

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Test "t" de Student).

TABLA XVIII. Hematimetría ($X \pm D.E.$) de pacientes de DMNID considerados globalmente y por grupos terapéuticos.

PARA-METRO	GRUPO I n= 24	GRUPO II n= 28	GRUPO III n= 47	TOTAL n= 99
G.R.	4,76 \pm 0,4	4,6 \pm 0,4	4,6 \pm 0,3	4,6 \pm 0,3
Hb	14,7 \pm 1,1	14,1 \pm 1,5	14,1 \pm 1,0	14,2 \pm 1,2
Hct	43,1 \pm 3	41,5 \pm 4,5	40,8 \pm 3,1	41,6 \pm 3,6
VCM	90,6 \pm 4,3	88,1 \pm 5,0	88,2 \pm 4,4	88,8 \pm 4,6
HCM	31,2 \pm 2	30,3 \pm 1,9	30,4 \pm 1,6	30,5 \pm 1,8
CHCM	34,2 \pm 0,9	34,3 \pm 0,8	34,5 \pm 0,7	34,4 \pm 0,8
Leuc	7,0 \pm 1,9	7,4 \pm 2,0	7,1 \pm 2,0	7,1 \pm 2,0
Neutr	53 \pm 8	54 \pm 7	55 \pm 8	54 \pm 8
Linfo	37 \pm 8	35 \pm 7	34 \pm 7	35 \pm 7
Plaq	222 \pm 46	250 \pm 77	251 \pm 56	244 \pm 61

* $p < 0,05$ v.s. Grupo I (Test Análisis de la Varianza)

TABLA XIX. Bioquímica sérica ($X \pm D.E.$) en el otal de pacientes de DMNID y clasificados por grupos terapéuticos.

PARA-METRO	GRUPO I n= 24	GRUPO II n= 28	GRUPO III n= 47	TOTAL n= 99
Gluc	122 \pm 66	** 172 \pm 29	** 178 \pm 61	163 \pm 59
Urea	37,3 \pm 6,9	** 46,9 \pm 10	** 45,7 \pm 12	43,7 \pm 11
Cr	1,0 \pm 0,1	0,99 \pm 0,1	* 0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
Ac.Ur	5,2 \pm 1,3	4,9 \pm 1,0	* 4,4 \pm 0,9	4,7 \pm 1,1
BT	0,73 \pm 0,3	0,61 \pm 0,2	0,72 \pm 0,2	0,69 \pm 0,2
Col	213 \pm 34	208 \pm 35	216 \pm 39	213 \pm 36
TG	117 \pm 69	124 \pm 47	124 \pm 65	122 \pm 61
F.Alc	116 \pm 49	** 81 \pm 26	** 80 \pm 26	87 \pm 33
GPT	24 \pm 11	25 \pm 9	24 \pm 6	24 \pm 8
GOT	19 \pm 4	19 \pm 3	20 \pm 4	20 \pm 4
ÔGT	25 \pm 16	23 \pm 11	22 \pm 11	23 \pm 12
LDH	157 \pm 30	158 \pm 27	176 \pm 34	168 \pm 33
Fe	91 \pm 27	## * 112 \pm 34	88 \pm 29	96 \pm 32
Zn	90 \pm 21	** 75 \pm 15	** 70 \pm 13	75 \pm 16
Ferr	164 \pm 94	# 191 \pm 148	113 \pm 91	147 \pm 116
HBA1	9,1 \pm 2,1	8,9 \pm 1,1	9,6 \pm 1,5	9,3 \pm 1,6

(* p < 0,05 ; ** p < 0,01 v.s. Grupo I) (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 v.s. Grupo III). Test Análisis de la varianza

TABLA XX. 1. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en todos los pacientes con DMNID y en el grupo control.

GRUPO	ALA-D $\mu\text{Mol. ALA/}$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol. ALA/}$ L.GR./min	PBG-D nMol. URO/ ml.GR./Hor	ALA-D Act ----- ALA-D
CONTROL n= 26	$34,3 \pm 9,0$	$66,8 \pm 8,8$	$27,6 \pm 4,7$	$2,1 \pm 0,80$
DMNID n= 99	*** $25,4 \pm 6,5$	*** $52,7 \pm 11$	*** $39,9 \pm 9,8$	$2,1 \pm 0,50$

*** p < 0,001 v.s. Control. (Test "t" de Student)

TABLA XX. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en los pacientes con DMNID clasificados por grupos terapéuticos y en el grupo control.

GRUPO	ALA-D $\mu\text{Mol. ALA/}$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol. ALA/}$ L.GR./min	PBG-D nMol. URO/ ml.GR./Hor	ALA-D Act - ----- ALA-D
CONTROL n= 26	$34,3 \pm 9,0$	$66,8 \pm 8,8$	$27,6 \pm 4,7$	$2,1 \pm 0,80$
GRUPO I n= 24	** $26,6 \pm 6,0$	** $54,1 \pm 10$	* $33,0 \pm 7,3$	$2,1 \pm 0,57$
GRUPO II n= 28	** $23,2 \pm 6,3$	** $51,5 \pm 12$	## ** $41,5 \pm 11$	$2,2 \pm 0,51$
GRUPO III n= 47	** $26,2 \pm 6,6$	** $52,7 \pm 11$	## ** $42,7 \pm 8,2$	$2,0 \pm 0,45$

(** p < 0,01; * p < 0,05 v.s. Control). (## p < 0,01 vs Grupo I-Dieta).
Test análisis de la varianza

TABLA XXI. Edad, años de evolución y superficie corporal de los enfermos de DMNID, en su totalidad y clasificados por grupos terapéuticos.

PARAMETRO	GRUPO I n= 24	GRUPO II n= 28	GRUPO III n= 47	TOTAL n= 99
EDAD (años)	62 ± 14	62 ± 10	61 ± 10	62 ± 11
EVOLUCION (años)	3,9 ± 3	10,3 ± 8 **	12,6 ± 8 **	9,8 ± 8
SUPERFICIE (m ²)	1,84 ± 0,2	1,73 ± 0,1	1,73 ± 0,1 *	1,76 ± 0,1

* p < 0,05; ** p < 0,01 v.s. Grupo I (Test análisis de la varianza)

TABLA XXII. Glucemia y HBA1 en el total de enfermos de DMNID (X ± D.E.) clasificados por el percentil 50 de la edad.

DMNID EDAD (años)	GLUCEMIA mg / dl	HBA1 %
≤ 64 años n= 50	159,8 ± 59,5	9,20 ± 1,46
> 64 años n= 49	167,4 ± 60,4	9,44 ± 1,77

No se aprecian diferencias significativas entre grupos.
Test "t" de Student

TABLA XXIII. Glucemia y HBA1 ($X \pm D.E.$) en el global de pacientes de DMNID, clasificados por el percentil 50 del tiempo del evolucion.

DMNID EVOLUCION (años)	GLUCEMIA mg / dl	HBA1 %
≤ 7 años n= 47	150,1 \pm 63,6	9,18 \pm 1,66
> 7 años n= 52	* 175,7 \pm 53,8	9,45 \pm 1,59

* $p < 0,05$ v.s. Grupo ≤ 7 años de Evolución (Test "t" de Student)

TABLA XXIV. Glucemia y HBA1 ($X \pm D.E.$) en el total de enfermos de DMNID, clasificados por el percentil 50 de su superficie corporal.

DMNID SUPERFICIE CORPORAL m ²	GLUCEMIA mg / dl	HBA1 %
$\leq 1,75$ m ² n= 50	169,9 \pm 59,3	9,48 \pm 1,72
$> 1,75$ m ² n= 49	157,1 \pm 60,2	9,15 \pm 1,50

No existen diferencias significativas entre grupos. (Test "t" de Student)

TABLA XXV. Glucemia y HBA1 ($X \pm D.E.$) en el total de enfermos de DMNID, clasificados según su sexo.

DMNID GRUPOS SEGUN EL SEXO	GLUCEMIA mg / dl	HBA1 %
VARONES n= 40	147,7 \pm 49,8	8,91 \pm 1,35
MUJERES n= 59	* 174,3 \pm 63,9	* 9,60 \pm 1,73

* $p < 0,05$ v.s. grupo de varones (Test "t" de Student).

TABLA XXVI. Enzimas eritrocitarias de la ruta hemo ($X \pm D.E.$) en el total de los pacientes con DMIND, clasificados según el percentil 50 de la edad.

DMNID EDAD (años)	ALA-D μ Mol ALA/ L.GR./min	ALA-D Act μ Mol ALA/ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
\leq 64 años n= 50	26,3 \pm 6,8	53,9 \pm 11	41,5 \pm 10	2,1 \pm 0,51
> 64 años n= 49	24,6 \pm 6,0	51,5 \pm 11	38,3 \pm 9,1	2,1 \pm 0,49

No existen diferencias significativas entre grupos (Test "t" de Student)

TABLA XVII. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm$ D.E.) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 del tiempo de evolucion.

DMNID EVOLUCION (años)	ALA-D μ Mol ALA/ L.GR./min	ALA-D Act μ Mol ALA/ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 7 años n= 47	25,5 \pm 5,9	53,9 \pm 11	37,3 \pm 10	2,1 \pm 0,52
> 7 años n= 52	25,4 \pm 7,0	51,6 \pm 11	** 42,5 \pm 8,8	2,1 \pm 0,48

** p < 0,01 v.s. grupo ≤ 7 años (Test "t" de Student)

TABLA XXVIII. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm$ D.E.) en el total de pacientes con DMNID, clasificados según el percentil 50 su superficie corporal.

DMNID SUPERFICIE CORPORAL (m ²)	ALA-D μ Mol ALA/ L.GR./min	ALA-D Act μ Mol ALA/ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
$\leq 1,75$ m ² n= 50	25,2 \pm 6,8	52,0 \pm 12	39,7 \pm 9,2	2,1 \pm 0,49
> 1,75 m ² n= 49	25,7 \pm 6,2	53,4 \pm 11	40,2 \pm 10	2,1 \pm 0,52

No existen diferencias significativas entre grupos (Test "t" de Student)

TABLA XXIX. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en el total de enfermos con DMNID, clasificados según su sexo.

DMNID SEGUN EL SEXO	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
VARONES n= 40	23,8 \pm 6,6	52,2 \pm 11	37,5 \pm 9,5	2,2 \pm 0,55
MUJERES n= 59	* 26,6 \pm 6,2	53,0 \pm 11	* 41,6 \pm 9,7	* 2,0 \pm 0,44

* $p < 0,01$ v.s. Grupo de Varones (Test "t" de Student)

TABLA XXX. 1. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en el total de pacientes con DMNID, clasificados por los cuartiles de la glucemia.

DMNID GLUCEMIA mg/dl	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
< 129 n= 25	27,2 \pm 6,2	56,0 \pm 8,7	37,7 \pm 11	2,1 \pm 0,56
129 - 156 n= 26	27,2 \pm 6,6	57,8 \pm 10 ##	40,7 \pm 9,6	2,1 \pm 0,41
157 - 199 n= 25	* 22,8 \pm 6,4	* 48,5 \pm 13	42,3 \pm 8,9	2,1 \pm 0,55
> 199 n= 23	24,4 \pm 5,8	# * 47,9 \pm 9,9	38,9 \pm 8,7	2,0 \pm 0,47

* $p < 0,05$ v.s. Grupo Glucemia < 129 mg/dl.

$p < 0,01$; # $p < 0,05$ v.s. Grupo 129 - 156 mg/dl. (Test análisis de la varianza)

TABLA XXX. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de la glucemia.

DMNID GLUCEMIA mg/dl	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 156 n= 51	$27,2 \pm 6,4$	$56,9 \pm 9,7$	$39,2 \pm 10$	$2,1 \pm 0,48$
> 156 n= 48	** $23,6 \pm 6,1$	*** $48,2 \pm 11$	$40,7 \pm 8,9$	$2,1 \pm 0,52$

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ v.s. Grupo Glucemia ≤ 156 mg/dl (Test "t" de student)

TABLA XXXI. 1. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por los cuartiles de HBA1.

DMNID HBA1	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
$< 8,1 \%$ n= 25	$27,8 \pm 7,0$	$58,8 \pm 10$	$40,2 \pm 10,2$	$2,2 \pm 0,54$
8,1- 9,1 n= 27	$25,0 \pm 5,8$	* $52,6 \pm 10$	$38,0 \pm 8,85$	$2,1 \pm 0,40$
9,2- 10,3 n= 24	$25,0 \pm 6,1$	* $50,9 \pm 9,5$	$42,2 \pm 11,4$	$2,1 \pm 0,59$
$> 10,3 \%$ n= 23	$23,9 \pm 6,7$	** $47,9 \pm 13$	$39,2 \pm 8,4$	$2,0 \pm 0,48$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ v.s. Grupo HBA1 $< 8,1 \%$ (Test análisis de la varianza)

TABLA XXXI. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de HBA1.

DMNID HBA1	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
$\leq 9,1 \%$ n = 52	$26,3 \pm 6,5$	$55,6 \pm 10$	$39,1 \pm 9,5$	$2,1 \pm 0,47$
$> 9,1 \%$ n = 47	$24,5 \pm 6,3$	** $49,5 \pm 11$	$40,8 \pm 10$	$2,0 \pm 0,53$

** $p < 0,01$ v.s. Grupo HBA1 $\leq 9,1 \%$ (Test "t" de Student)

TABLA XXXII. 1. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por los cuartiles del Fe.

DMNID Fe $\mu\text{g}/\text{dl}$	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
< 70 N = 22	$27,3 \pm 6,5$	$53,0 \pm 11$	$38,1 \pm 10$	$2,0 \pm 0,49$
70 - 92 n = 22	$27,5 \pm 4,9$	$56,8 \pm 12$	$42,0 \pm 11,2$	$2,0 \pm 0,39$
93 - 115 n = 23	$22,7 \pm 6,3$	$51,6 \pm 12$	$40,8 \pm 9,5$	* $2,3 \pm 0,57$
> 115 n = 20	* $23,2 \pm 7,7$	$50,2 \pm 10$	$41,6 \pm 9,2$	@ $2,2 \pm 0,56$

@ $p < 0,1$; * $p < 0,05$ v.s. Grupo Fe $< 70 \mu\text{g}/\text{dl}$ (Test Análisis de la varianza)

TABLA XXXII. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de Fe.

DMNID Fe $\mu\text{g/dl}$	ALA-D $\mu\text{Mol ALA/}$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA/}$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 92 n= 44	$27,4 \pm 5,7$	$54,9 \pm 12$	$40,0 \pm 11$	$2,0 \pm 0,44$
> 92 n= 43	** $22,9 \pm 6,9$	$50,9 \pm 11$	$41,2 \pm 9,2$	* $2,3 \pm 0,55$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ v.s. Grupo $\leq 92 \mu\text{g/dl}$ (Test "t" de Student)

TABLA XXXII. 3. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en el Grupo I (Dieta) de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de Fe.

DMNID Fe $\mu\text{g/dl}$ GRUPO I	ALA-D $\mu\text{Mol ALA/}$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA/}$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 91 n= 9	$27,6 \pm 5,9$	$55,5 \pm 13$	$29,7 \pm 3,5$	$2,0 \pm 0,46$
> 91 n= 8	$24,6 \pm 7,1$	$54,8 \pm 8,3$	$35,7 \pm 10$	$2,3 \pm 0,78$

No se encuentran diferencias significativas entre grupos (Test "t" de Student)

TABLA XXXII. 4. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en el Grupo II (Sulfonilurea) de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de Fe.

DMNID Fe $\mu\text{g/dl}$ GRUPO II	ALA-D $\mu\text{Mol ALA/}$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA/}$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 112 n= 14	$23,6 \pm 5,7$	$52,2 \pm 14$	$42,1 \pm 13$	$2,2 \pm 0,54$
> 112 n= 12	$22,1 \pm 7,4$	$50,6 \pm 11$	$41,7 \pm 9,4$	$2,3 \pm 0,50$

No se encuentran diferencias significativas entre grupos
(Test "t" de student)

TABLA XXXII. 5. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en el Grupo III (Insulina) de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de Fe.

DMNID Fe $\mu\text{g/dl}$ GRUPO III	ALA-D $\mu\text{Mol ALA/}$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA/}$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 85 n= 22	$28,2 \pm 6,5$	$55,3 \pm 12$	$41,5 \pm 8,3$	$2,0 \pm 0,46$
> 85 n= 22	@ $24,3 \pm 6,6$	$50,6 \pm 12$	$44,6 \pm 8,2$	$2,1 \pm 0,45$

@ $p < 0,1$ v.s. Grupo $\leq 85 \mu\text{g/dl}$ (Test "t" de student)

TABLA XXXIII. 1. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por los cuartiles de la Ferritina.

DMNID FERRITINA ng/ml	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
< 66 n = 22	** $27,8 \pm 6,6$	* $55,8 \pm 13$	$38,7 \pm 6,5$	$2,0 \pm 0,54$
66 - 122 n = 21	* $26,2 \pm 7,3$	* $55,2 \pm 11$	$41,5 \pm 10,3$	$2,1 \pm 0,49$
122 - 217 n = 21	* $25,2 \pm 6,6$	$52,0 \pm 11$	$37,6 \pm 11,6$	$2,1 \pm 0,42$
> 217 n = 21	$21,2 \pm 4,9$	$47,4 \pm 10$	$43,4 \pm 10,2$	$2,3 \pm 0,61$

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ v.s. Grupo Ferritina > 217 ng/ml
(Test Análisis de la varianza)

TABLA XXXIII. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de la Ferritina.

DMNID FERRITINA ng/ml	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 122 n = 43	** $27,0 \pm 6,9$	* $55,5 \pm 12$	$40,1 \pm 8,6$	$2,1 \pm 0,51$
> 122 n = 42	$23,2 \pm 6,0$	$49,7 \pm 11$	$40,6 \pm 11$	$2,2 \pm 0,52$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ v.s. Grupo con Ferritina > 122
ng/ml (Test "t" de student)

TABLA XXXIII. 3. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($\bar{X} \pm D.E.$) en el Grupo I (Dieta) de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de la Ferritina.

DMNID FERRITINA ng/ml GRUPO I	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 140 n= 9	29,5 \pm 5,8	57,9 \pm 11	29,5 \pm 5,5	2,0 \pm 0,4
> 140 n= 8	* 21,9 \pm 4,5	52,1 \pm 10	35,9 \pm 9,7	2,4 \pm 0,7

* $p < 0,05$ v.s. Grupo con Ferritina ≤ 140 ng/ml (Test "t" de Student)

TABLA XXXIII. 4. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($\bar{X} \pm D.E.$) en el Grupo II (Sulfonilurea) de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de la Ferritina.

DMNID FERRITINA ng/ml GRUPO II	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 140 n= 14	24,1 \pm 6,9	54,1 \pm 12	43,5 \pm 12	2,3 \pm 0,5
> 140 n= 12	21,6 \pm 6,0	47,1 \pm 10	40,2 \pm 9,6	2,2 \pm 0,4

No se encuentran diferencias significativas entre grupos (Test "t" de Student)

TABLA XXXIII. 5. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en el Grupo III (Insulina) de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de la Ferritina.

DMNID FERRITINA ng/ml GRUPO III	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
$\leq 87,5$ n= 22	$27,4 \pm 7,6$	$54,9 \pm 14$	$40,6 \pm 6,9$	$2,0 \pm 0,4$
$> 87,5$ n= 22	$25,0 \pm 6,0$	$50,5 \pm 9,5$	@ $44,7 \pm 8,2$	$2,0 \pm 0,4$

@ $p < 0,1$ v.s. Grupo con Ferritina $\leq 87,5$ ng/ml (Test "t" de Student)

TABLA XXXIV. 1. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por los cuartiles del Zn.

DMNID Zn $\mu\text{g}/\text{dl}$	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ L.GR./min	PBG-D nMol URO/ ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
< 65 n= 23	$26,5 \pm 7,7$	$52,7 \pm 11$	$40,3 \pm 6,7$	$2,0 \pm 0,58$
65 - 74 n= 21	$23,1 \pm 6,6$	$52,8 \pm 13$	$42,3 \pm 10,0$	$2,3 \pm 0,59$
75 - 84 n= 21	$24,3 \pm 5,4$	$52,9 \pm 12$	$42,5 \pm 8,7$	$2,1 \pm 0,36$
> 84 n= 20	$26,2 \pm 6,4$	$54,0 \pm 11$	$38,7 \pm 13,7$	$2,1 \pm 0,45$

No existen diferencias significativas entre grupos (Test Análisis de la varianza)

TABLA XXXIV. 2. Enzimas eritrocitarias de la ruta del hemo ($X \pm D.E.$) en la totalidad de los pacientes con DMNID, clasificados por el percentil 50 de Zn.

DMNID Zn $\mu\text{g}/\text{dl}$	ALA-D $\mu\text{Mol ALA}/$ $\text{L.GR.}/\text{min}$	ALA-D Act $\mu\text{Mol ALA}/$ $\text{L.GR.}/\text{min}$	PBG-D $\text{nMol URO}/$ $\text{ml.GR.}/\text{Hora}$	ALA-D Act ----- ALA-D
≤ 74 $n = 43$	$24,8 \pm 7,4$	$52,5 \pm 12$	$41,6 \pm 8,3$	$2,2 \pm 0,6$
> 74 $n = 42$	$25,3 \pm 5,9$	$53,7 \pm 11$	$40,4 \pm 11$	$2,1 \pm 0,3$

No existen diferencias significativas entre grupos (Test "t" de Student)

TABLA XXXV. 1. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm D.E.$), en el total de enfermos de DMNID y en el grupo control.

GRUPO	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
CONTROL $n = 26$	$31,0 \pm 10,8$	$0,33 \pm 0,17$	$71,34 \pm 40$
DMNID $n = 99$	$29,6 \pm 17,2$	* $0,43 \pm 0,28$	*** $109,9 \pm 63$

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ v.s. Control. (Test "t" de Student)

TABLA XXXV. 2. Porphirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en los 3 grupos terapéuticos de enfermos con DMNID y en el grupo control.

GRUPO	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
CONTROL n= 26	31,0 \pm 10,8	0,33 \pm 0,17	71,34 \pm 40
GRUPO I n= 24	27,0 \pm 15,3	0,38 \pm 0,22	84,77 \pm 50
GRUPO II n= 28	30,1 \pm 19,0	0,36 \pm 0,18	** 107,9 \pm 47 #
GRUPO III n= 47	30,7 \pm 17,2	0,49 \pm 0,34	** 122,5 \pm 74

** $p < 0,01$ v.s. Control. # $p < 0,05$ vs Grupo I (Dieta)
(Test Análisis de la varianza)

TABLA XXXVI. 1. Porphirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en el global de enfermos de DMNID, clasificados según los cuartiles de la edad.

DMNID EDAD (años)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
< 55 años n= 25	31,3 \pm 17,5	0,36 \pm 0,27	* 99,06 \pm 46
56 - 64 n= 25	26,6 \pm 12,2	0,44 \pm 0,31	110,7 \pm 58
65 - 69 n= 25	29,3 \pm 18,1	0,48 \pm 0,22	143,0 \pm 85
> 69 años n= 24	31,4 \pm 20,7	0,44 \pm 0,31	* 89,1 \pm 51

* $p < 0,05$ v.s. Grupo 65 - 69 años (Test Análisis de la varianza)

TABLA XXXVI. 2. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en enfermos de DMNID clasificados según el percentil 50 de la edad.

DMNID EDAD (años)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
≤ 64 años n= 50	$28,9 \pm 15,1$	$0,40 \pm 0,29$	$104,6 \pm 52$
> 64 años n= 49	$30,3 \pm 19,2$	$0,46 \pm 0,26$	$115,4 \pm 74$

No se aprecian diferencias significativas entre grupos
(Test "t" de Student)

TABLA XXXVII. 1. Porfirinas en plasma, hematíes y orina, ($X \pm$ D.E.) del total de enfermos de DMNID, clasificados por los cuartiles del tiempo de evolución.

DMNID EVOLUCION (años)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
< 4 años n= 23	$26,4 \pm 19$	$0,38 \pm 0,20$	$105,8 \pm 55$
4 - 7 n= 24	$27,4 \pm 14$	$0,36 \pm 0,20$	$115,4 \pm 66$
8 - 13 n= 28	$35,3 \pm 17$	$0,47 \pm 0,28$	$93,2 \pm 47$
> 13 años n= 24	$28,3 \pm 15$	$0,50 \pm 0,39$	$125,3 \pm 91$

No existen diferencias significativas entre grupos. (Test análisis de la varianza)

TABLA XXXVII. 2. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm D.E.$) del global de enfermos de DMNID, clasificados por el percentil 50 del tiempo de evolución.

DMNID EVOLUCION (años)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
≤ 7 años n= 47	26,9 \pm 17,1	0,37 \pm 0,20	110,5 \pm 60
> 7 años n= 52	32,1 \pm 17,1	* 0,48 \pm 0,33	109,2 \pm 67

* $p < 0,05$ v.s. Grupo ≤ 7 años de evolución. (Test "t" de Student)

TABLA XXXVIII. 1. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm D.E.$) del total de enfermos de DMNID, clasificados por los cuartiles de la superficie corporal.

DMNID SUPERFICIE CORPORAL (m^2)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
$< 1,63$ n= 26	28,9 \pm 19	0,36 \pm 0,18	85,0 \pm 47
1,63-1,75 n= 25	25,0 \pm 13	0,41 \pm 0,24	124,6 \pm 81
1,76-1,89 n= 24	29,4 \pm 15	0,54 \pm 0,43	112,2 \pm 50
$> 1,89$ n= 24	35,3 \pm 19	0,41 \pm 0,19	118,1 \pm 65

No existen diferencias significativas entre grupos (Test Análisis de la varianza)

TABLA XXXVIII. 2. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.) del total de enfermos de DMNID, clasificados por el percentil 50 de su superficie corporal.

DMNID SUPERFICIE CORPORAL (m ²)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
$\leq 1,75 \text{ m}^2$ n= 50	27,3 \pm 16	0,37 \pm 0,20	104,4 \pm 69
> 1,75 m ² n= 49	32,0 \pm 17	@ 0,48 \pm 0,33	115,5 \pm 57

No existen diferencias significativas entre grupos. (Test "t" de Student)

TABLA XXXIX. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.) del global de enfermos de DMNID, clasificados por sexos.

DMNID SEXO	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
VARONES n= 40	29,8 \pm 18,6	0,44 \pm 0,28	116,4 \pm 49
MUJERES n= 59	29,5 \pm 16,3	0,42 \pm 0,28	105,3 \pm 72

No existen diferencias significativas entre grupos. (Test "t" de Student)

TABLA XL. 1. Porphirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en el total de enfermos de DMNID, clasificados por los cuartiles de la glucemia.

DMNID GLUCEMIA (mg/dl)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
< 129 n= 25	31,3 \pm 16,9	0,40 \pm 0,19	95,04 \pm 50
129 - 156 n= 26	29,8 \pm 19,5	0,44 \pm 0,20	129,95 \pm 58
157 - 199 n= 25	27,6 \pm 13,9	0,47 \pm 0,38	101,05 \pm 45
> 199 n= 23	29,7 \pm 18,8	0,40 \pm 0,30	112,73 \pm 92

No se encontraron diferencias significativas entre grupos.
(Test Análisis de la varianza)

TABLA XL. 2. Porphirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en el total de enfermos de DMNID, clasificados por el percentil 50 de la glucemia.

DMNID GLUCEMIA (mg/dl)	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
\leq 156 n= 51	30,5 \pm 18,1	0,42 \pm 0,20	112,85 \pm 57
> 156 n= 48	28,6 \pm 16,3	0,44 \pm 0,35	106,62 \pm 71

No existen diferencias significativas entre grupos. (Test "t" de Student)

TABLA XLI. 1. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en el total de enfermos de DMNID, clasificados por los cuartiles de la HBA1.

DMNID HBA1 %	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
< 8,1 % n= 25	30,5 \pm 16,4	0,39 \pm 0,16	104,16 \pm 48
8,1 - 9,1 n= 27	30,4 \pm 18,6	0,43 \pm 0,32	121,21 \pm 63
9,2- 10,3 n= 24	29,0 \pm 17,3	0,36 \pm 0,17	106,28 \pm 76
> 10,3 % n= 23	28,3 \pm 17,3	0,53 \pm 0,39	106,17 \pm 67

No se encontraron diferencias significativas entre grupos. (Test Análisis de la varianza)

TABLA XLI. 2. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en el total de enfermos de DMNID, clasificados por el percentil 50 de la HBA1.

DMNID HBA1 %	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
\leq 9,1 % n= 52	30,5 \pm 17,4	0,41 \pm 0,25	113,21 \pm 57
> 9,1 % n= 47	28,7 \pm 17,1	0,44 \pm 0,31	106,23 \pm 71

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. (Test "t" de Student)

TABLA XLII. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en el total de enfermos de DMNID, clasificados por el percentil 50 del Fe.

DMNID Fe $\mu\text{g/dl}$	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
≤ 92 n= 44	$31,8 \pm 17,8$	$0,44 \pm 0,31$	$100,06 \pm 51$
> 92 n= 43	$27,5 \pm 16,7$	$0,42 \pm 0,26$	* $126,24 \pm 64$

p < 0,05 v.s. Grupo con Fe $\leq 92 \mu\text{g/dl}$. (Test "t" de Student)

TABLA XLIII. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en el total de enfermos de DMNID, clasificados por el percentil 50 de la Ferritina.

DMNID FERRITINA ng/ml	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
≤ 122 n= 43	$33,4 \pm 19,6$	$0,44 \pm 0,27$	$111,30 \pm 50$
> 122 n= 42	@ $26,1 \pm 14,3$	$0,40 \pm 0,29$	$110,51 \pm 63$

@ p < 0,1 v.s. Grupo con Ferritina $\leq 122 \text{ ng/ml}$. (Test "t" de Student)

TABLA XLIV. Porfirinas en plasma, hematíes y orina ($X \pm$ D.E.), en el total de enfermos de DMNID, clasificados por el percentil 50 del Zn.

DMNID Zn $\mu\text{g}/\text{dl}$	HEMATIES $\mu\text{g} / \text{dl}$	PLASMA $\mu\text{g} / \text{dl}$	ORINA $\mu\text{g} / \text{L}$
≤ 74 n= 43	$31,8 \pm 16,3$	$0,47 \pm 0,29$	$125,69 \pm 67$
> 74 n= 42	$27,0 \pm 18,1$	$0,38 \pm 0,26$	[*] $99,77 \pm 47$

* $p < 0,05$ v.s. Grupo con Zn $\leq 74 \mu\text{g}/\text{dl}$. (Test "t" de Student)

TABLA XLV 1. GRUPO A (CONTROL). Valores enzimáticos individuales.
 SANGRE: ALA-D [μ Moles ALA / L. GR. / min.], PBG-D [nMoles de URO / ml. GR. / Hora]. HIGADO: ALA-D [nMoles PBG / mg. prot / min], PBG-D [nMoles URO / mg. prot / Hora].

R A T A	SANGRE				HIGADO			
	nº	ALA-D	ALA-D Act	PBG-D	ALAD Act/ ALAD	ALA-D	ALA-D Act	PBG-D
1	3.58	4.91	14.71	1.24	0.296	0.375	0.203	1.19
2	6.04	6.26	32.73	1.13	0.226	0.240	0.194	1.40
3	6.86	11.89	37.19	1.17	0.238	0.255	0.205	1.31
4	7.32	7.87	34.36	1.37	0.289	0.306	0.227	1.26
5	4.05	4.77	40.52	1.03	0.166	0.173	0.194	1.06
6	5.12	5.47	26.62	1.73	0.218	0.218	0.226	1.07
7	6.85	7.07	35.72	1.07	0.206	0.207	0.160	1.05
8	3.70	4.99	16.86	1.17	0.389	0.447	0.211	1.04
9	3.98	5.51	19.08	1.06	0.323	0.369	0.174	1.00
10	4.85	5.92	20.22	1.03	0.385	0.403	0.164	1.00
11	5.15	6.02	19.2	1.34	0.416	0.416	0.164	1.14
12	4.75	5.57	46.01	1.38	0.235	0.308	0.403	1.14
13	5.70	6.47	51.83	1.22	0.177	0.248	0.354	1.04
14	3.60	4.47	33.23	1.16	0.176	0.211	0.334	1.00
X	5.11	6.22	30.59	1.22	0.267	0.298	0.229	1.12
DE	1.28	1.87	11.4	0.18	0.083	0.089	0.077	0.12

TABLA XLV. 2. GRUPO B (INYECTADAS NO DIABETICAS). Valores enzimáticos individuales. SANGRE: ALA-D [μ Moles ALA / L. GR. / min.], PBG-D [nMoles de URO / ml. GR. / Hora]. HIGADO: ALA-D [nMoles PBG / mg. prot / min], PBG-D [nMoles URO / mg. prot / Hora].

R A T A	SANGRE				HIGADO				
	nº	ALA-D	ALA-D Act	PBG-D	ALAD Act/ ALAD	ALA-D	ALA-D Act	PBG-D	ALAD Act/ ALAD
	15	4.87	5.17	30.86	1.55	0.255	0.294	0.252	1.13
	16	4.87	5.06	32.87	1.06	0.270	0.292	0.237	1.15
	17	3.55	4.03	21.89	1.03	0.231	0.312	0.217	1.08
	18	5.07	5.11	35.28	1.13	0.243	0.314	0.225	1.35
	19	3.65	3.71	30.98	1.00	0.239	0.297	0.265	1.29
	20	4.18	5.78	27.10	1.01	0.267	0.293	0.206	1.24
	21	4.64	6.57	29.95	1.38	0.217	0.290	0.218	1.09
	22	2.94	4.54	20.21	1.41	0.257	0.285	0.247	1.33
	23	3.72	5.18	30.39	1.54	0.217	0.233	0.185	1.10
	24	2.18	2.73	26.63	1.39	0.274	0.432	0.247	1.07
	25	3.42	5.32	40.90	1.25	0.251	0.284	0.322	1.57
	X	3.91	4.83	29.73	1.25	0.247	0.302	0.238 0.036	1.22
	DE	0.90	1.04	5.80	0.21	0.019	0.047		0.15

TABLA XLV. 3. GRUPO C (DIABETICAS). Valores enzimáticos individuales.
 SANGRE: ALA-D [μ Moles ALA / L. GR. / min.], PBG-D [nMoles de URO / ml. GR./Hora]. HIGADO: ALA-D [nMoles PBG / mg. prot / min], PBG-D [nMoles URO / mg. prot / Hora].

R A T A	SANGRE				HIGADO			
	nº	ALA-D	ALA-D Act	PBG-D	ALAD Act/ ALAD	ALA-D	ALA-D Act	PBG-D
26	5.67	6.90	31.33	1.21	0.180	0.190	0.250	1.05
27	4.74	4.74	38.50	1.00	0.170	0.195	0.252	1.14
28	4.05	4.94	28.62	1.21	0.185	0.216	0.241	1.16
29	5.03	5.19	35.07	1.03	0.178	0.205	0.239	1.15
30	5.32	7.55	33.71	1.41	0.235	0.318	0.224	1.35
31	3.97	4.26	24.12	1.07	0.176	0.208	0.230	1.18
32	3.61	5.55	22.94	1.53	0.242	0.283	0.248	1.16
33	3.59	4.79	24.79	1.33	0.203	0.212	0.249	1.04
34	2.10	3.67	32.56	1.74	0.141	0.145	0.363	1.02
35	3.64	3.64	38.70	1.00	0.237	0.248	0.584	1.04
36	3.09	3.23	44.30	1.04	0.133	0.141	0.349	1.06
37	2.10	2.96	43.12	1.40	0.128	0.143	0.340	1.11
38	3.25	2.39	38.85	1.01	0.125	0.146	0.279	1.16
39	3.15	3.43	40.34	1.08	0.124	0.144	0.308	1.16
X	3.74	4.51	34.06	1.22	0.175	0.199	0.296	1.13
DE	1.14	1.46	7.01	0.23	0.042	0.055	0.094	0.08

TABLA XLVI. 1. GRUPO A (CONTROL); Porfirinas en tejido hepático (COPROporfirina, UROporfirina, PROTOporfirina y TOTAL); Proteínas tisulares hepáticas; valores individuales.

RATA Nº	COPRO µg / g.prot	URO µg / g.prot	PROTO µg / g.prot	TOTAL µg / g.prot	PROTEINA mg / g. tej
1	14.3	18.7	67.8	100.8	15.82
2	27.9	24.7	58.0	110.6	23.73
3	32.1	20.4	59.5	112.0	23.4
4	27.8	21.8	66.2	115.8	20.43
5	23.2	21.4	71.4	116.0	23.62
6	25.0	18.6	63.7	107.3	22.46
7	32.7	29.8	78.1	140.6	25.95
8	14.3	13.7	63.0	91.0	15.82
9	13.8	13.7	54.5	82.0	19.08
10	16.6	11.9	56.4	84.9	16.87
11	13.4	20.5	63.9	97.8	17.96
12	22.5	57.4	36.4	116.3	20.55
13	15.9	37.0	33.1	86.0	24.67
14	15.3	36.5	34.5	86.3	23.92
X	21.05	24.72	57.60	103.38	21.02
D.E.	7.09	12.15	13.84	16.62	3.42

TABLA XLVI. 2. GRUPO B (INYECTADAS NO DIABETICAS); Porphirinas en tejido hepático (COPROporfirina, UROporfirina, PROTOporfirina y TOTAL); Proteínas tisulares hepáticas; valores individuales.

RATA Nº	COPRO µg / g.prot	URO µg / g.prot	PROTO µg / g.prot	TOTAL µg / g.prot	PROTEINA mg / g tej
15	32.3	24.7	80.4	137.4	21.41
16	25.3	27.6	18.9	71.8	19.31
17	34.8	28.3	66.2	129.3	18.75
18	33.2	26.5	70.9	130.6	21.3
19	38.1	17.2	65.0	120.3	19.27
20	17.5	17.5	76.5	110.1	18.0
21	17.7	20.0	71.1	108.8	16.5
22	16.2	14.6	54.3	85.1	16.5
23	16.4	17.8	57.9	92.1	19.87
24	14.0	14.2	39.0	67.2	16.87
25	25.9	19.0	51.1	96.0	25.8
X	24.67	20.54	59.20	104.42	19.41
S.E.	8.77	5.28	17.98	23.96	2.72

TABLA XLVI. 3. GRUPO C (DIABETICAS); Porfirinas en tejido hepático (COPROporfirina, UROporfirina, PROTOporfirina y TOTAL); Proteínas tisulares hepáticas; valores individuales.

RATA Nº	COPRO µg / g prot	URO µg / g prot	PROTO µg / g prot	TOTAL µg / g prot	PROTEINAS mg / g tej
26	40.6	10.9	13.4	64.9	18.07
27	34.9	32.6	78.6	146.1	17.92
28	32.4	27.7	70.2	130.3	19.5
29	40.7	46.1	84.9	171.7	18.9
30	23.3	7.89	68.4	99.59	17.62
31	15.8	13.3	54.2	83.3	18.0
32	15.6	15.3	65.8	96.7	18.37
33	19.5	15.1	57.1	91.7	17.62
34	30.8	34.7	62.0	127.5	26.17
35	36.0	43.1	80.5	159.6	16.5
36	25.6	32.6	87.3	145.5	26.47
37	34.0	13.1	40.4	87.5	29.25
38	24.0	28.8	57.0	109.8	29.25
39	31.1	37.9	67.0	136.0	27.52
X	28.87	25.64	63.34	117.8	21.51
D.E.	8.37	12.79	19.34	31.9	4.92

TABLA XLVII. Glucemia y peso finales ($X \pm D.E.$) en los 3 grupos de animales de experimentación.

GRUPOS	PESO FINAL (g)	GLUCEMIA FINAL (mg/dl)
GRUPO A n= 14	449,6 \pm 34,1	124,0 \pm 18,1
GRUPO B n= 11	411,5 \pm 78,8	* 181,4 \pm 44,8
GRUPO C n= 14	** ## 326,2 \pm 90,0	** ## 412,7 \pm 75,4

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ v.s. GRUPO A (Control).

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$ v.s. GRUPO B (Inyectadas no diabéticas).
(Test Análisis de la varianza)

TABLA XLVIII. Enzimas eritrocitarias de la ruta hemo ($X \pm D.E.$) en animales de experimentación.

GRUPO	ALA-D μ Mol ALA/ L.GR./ min	ALA-D Act μ Mol ALA / L. GR./ min	PBG-D nMol URO / ml.GR./Hora	ALA-D Act ----- ALA-D
A n= 14	5.11 \pm 1.28	6.22 \pm 1.87	30.59 \pm 11.4	1.22 \pm 0.18
B n= 11	* 3.91 \pm 0.90	* 4.83 \pm 1.04	29.73 \pm 5.80	1.25 \pm 0.21
C n= 14	** 3.74 \pm 1.14	* 4.51 \pm 1.46	34.06 \pm 7.01	1.22 \pm 0.23

* $p < 0.05$ v.s. GRUPO A (Control).

** $p < 0.01$ v.s. GRUPO A (Control). (Test Análisis de la varianza)

TABLA XLIX. Enzimas hepáticas de la ruta hemo ($X \pm D.E.$) en animales de experimentación.

GRUPO	ALA-D nMol PBG/ mg.prot/min	ALA-D Act nMol PBG/ mg.prot./min	PBG-D nMol URO/ mg.prot/Hor	ALA-D Act ----- ALA-D
A n= 14	0.267 \pm 0.083	0.298 \pm 0.089	0.229 \pm 0.077	1.12 \pm 0.12
B n= 11	0.247 \pm 0.019	0.302 \pm 0.047	0.238 \pm 0.036	1.22 \pm 0.15
C n= 14	** 0.175 \pm 0.042	** 0.199 \pm 0.055	0.296 \pm 0.094	1.13 \pm 0.08

**** p < 0.01 v.s. GRUPO A (Control).** (Test Análisis de la varianza)

TABLA L. COPRO; URO; PROTO; Porfirinas TOTALES y PROTEÍNAS en tejido Hepático ($X \pm D.E.$).

GRUPO	COPRO μ g/ g.prot	URO μ g/ g.prot	PROTO μ g/ g.prot	TOTAL μ g/ g.prot	PROT mg/ g.tej
A n= 14	21.05 \pm 7.09	24.72 \pm 12.15	57.60 \pm 13.84	103.3 \pm 16.62	21.02 \pm 3.42
B n= 11	24.67 \pm 8.77	20.54 \pm 5.28	59.20 \pm 17.98	104.4 \pm 23.96	19.41 \pm 2.72
C n= 14	* 28.87 \pm 8.37	25.64 \pm 12.79	63.34 \pm 19.30	117.8 \pm 31.90	21.51 \pm 4.92

*** p < 0.05 v.s. GRUPO A (Control).** (Test Análisis de la varianza)

CORRELACIONES ENTRE EDAD, TIEMPO DE EVOLUCION, SUPERFICIE CORPORAL, GLUCEMIA Y EL PORCENTAJE DE LA HBA1 EN DMID.-

Se muestran unicamente, las correlaciones significativas ($p < 0,05$),
n = 32.

* Edad ; Evolución	r = 0,61
* Edad ; Superficie Corporal	r = 0,67
* Superficie Corporal ; Glucemia	r = 0,34
* Edad ; HBA1	r = 0,45
* Evolución ; HBA1	r = 0,56
* Superficie Corporal ; HBA1	r = 0,37

CORRELACIONES ENTRE EDAD, TIEMPO DE EVOLUCION Y ENZIMAS ERITROCITARIAS DE LA RUTA HEMO ASI COMO PORFIRINAS EN HEMATIES, PLASMA Y ORINA EN PACIENTES CON DMID.-

Se muestran unicamente, las correlaciones significativas ($p < 0,05$).

I.- Correlaciones con las enzimas de la ruta hemo:

* Edad ; Cociente ALA-D Act / ALA-D	r = 0,63
* Evolución ; ALA-D	r = - 0,37
* Evolución ; Cociente ALA-D Act / ALA-D	r = 0,40

II.- Correlaciones con porfirinas en hematies, plasma y orina:

* Edad ; Porphirinas Urinarias	r = 0,49
* Edad ; Porphirinas Plasmáticas	r = 0,48
* Evolución ; Porphirinas Plasmáticas	r = 0,42

CORRELACIONES ENTRE EDAD, TIEMPO DE EVOLUCION, SUPERFICIE CORPORAL, GLUCEMIA, PORCENTAJE DE.HBA1 EN DMNID, ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO Y PORFIRINAS EN HEMATIES, PLASMA Y ORINA.-

Se muestran únicamente, las correlaciones significativas ($p < 0,05$).

1.- EDAD

* Evolución: TOTAL (n = 99)	r = 0,26
GRUPO III (n = 47)	r = 0,18
* HBA1: GRUPO II (n = 28)	r = 0,37

2.- EVOLUCION

* Enzimas de la ruta hemo:	
/ PBG-D GRUPO I (n = 24)	r = 0,76
* Porfirinas en hematíes, plasma y orina:	
/ Porfirinas Hematíes	
GRUPO I (n = 24)	r = 0,42

3. SUPERFICIE CORPORAL

* HBA1: GRUPO II (n = 28)	r = - 0,54
---------------------------	------------

4. GLUCEMIA y HBA1

* TOTAL (n = 99)	r = 0,45
* GRUPO I (n = 24)	r = 0,63
* GRUPO II (n = 28)	r = 0,43
* GRUPO III (n = 47)	r = 0,36

CORRELACIONES ENTRE GLUCEMIA, PORCENTAJE DE HBA1, ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO Y PORFIRINAS EN HEMATIES, PLASMA Y ORINA EN PACIENTES CON DMNID.-

Se reflejan sólo, las correlaciones significativas ($p < 0,05$), en los diferentes Grupos terapéuticos y en el total de pacientes con DMNID.

1.- GLUCEMIA

* ALA-D: - TOTAL DMNID (n = 99)	r = - 0,26
* ALA-D Act: - GRUPO II (n = 28)	r = - 0,42
- GRUPO III (n = 47)	r = - 0,33
- TOTAL DMNID (n = 99)	r = - 0,29

2.- HBA1

* ALA-D: - GRUPO II (n = 28)	r = - 0,36
- GRUPO III (n = 47)	r = - 0,41
- TOTAL DMNID (n = 99)	r = - 0,26
* ALA-D Act: - GRUPO I (n = 24)	r = - 0,40
- GRUPO II (n = 28)	r = - 0,51
- GRUPO III (n = 47)	r = - 0,39
- TOTAL DMNID (n = 99)	r = - 0,39

CORRELACIONES ENTRE SIDEREMIA, CINC, FERRITINA Y ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO.-

Se muestran unicamente, las correlaciones significativas ($p < 0,05$), en los tres grupos terapéuticos y en el total de enfermos con DMNID.

1.- SIDEREMIA

* ALA-D:- TOTAL DMNID (n = 87)	r = - 0,28
* PORFIRINAS URINARIAS:	
- TOTAL DMNID (n = 87)	r = 0,25
- GRUPO I (n = 16)	r = 0,42
- GRUPO II (n = 24)	r = 0,50

2.- FERRITINA

* ALA-D - GRUPO I (n = 17)	r = - 0,66
* ALA-D Act - TOTAL DMNID (n = 85)	r = - 0,23
* PBG-D - GRUPO I (n = 17)	r = 0,53
- GRUPO III (n = 40)	r = 0,39
* ALA-D Act / ALA-D: GRUPO I (n = 17)	r = 0,37
* PORFIRINAS HEMATIES: - GRUPO II (n = 26)	r = - 0,42

4.- SIDEREMIA / FERRITINA (n = 84)	r = 0,37
------------------------------------	----------

CORRELACIONES ENTRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO EN HEMATIES Y EN TEJIDO HEPATICO, EL PESO Y LA GLUCEMIA FINAL EN LOS TRES GRUPOS DE RATAS.

1.- PESO FINAL

/ Enzimas eritrocitarias:

* GRUPO C (n= 14): ALA-D Act	r= 0,69
PBG-D	r= - 0,65
* GRUPO B+C (n= 25): ALA-D Act	r= 0,55
PBG-D	r= - 0,61

/ Enzimas hepáticas:

* GRUPO A: PBG-D	r= - 0,50
* GRUPO C: ALA-D	r= 0,64
ALA-D Act	r= 0,80
PBG-D	r= - 0,54
* GRUPO B+C: ALA-D	r= 0,64
ALA-D Act	r= 0,67
PBG-D	r= - 0,56

2.- GLUCEMIA FINAL

/ Enzimas hepáticas:

* GRUPO A: PBG-D	r= - 0,50
* GRUPO B: PBG-D	r= - 0,84
* GRUPO B+C: ALA-D	r= - 0,71
ALA-D Act	r= - 0,70

COMENTARIOS

ALTERACIONES DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO EN DIABETES MELLITUS.-

El grupo prostético hemo es necesario en todas las células corporales. En el adulto, se sintetiza el 85% en las células eritroides de la médula ósea y la mayor parte del resto en el tejido hepático. Básicamente, se emplea en la médula ósea para la síntesis de hemoglobina y en tejido hepático para la síntesis de hemoproteínas, en especial el grupo de citocromos microsómicos denominados P-450 (42).

La DM y las porfirias son dos enfermedades asociadas (132, 133), asociación más marcada para la porfiria cutánea tarda probablemente por ser la forma más frecuente (134, 135, 136, 137, 141, 142).

Los pacientes diagnosticados de porfirias es frecuente que presenten una curva de sobrecarga oral de glucosa alterada y una hipersecreción de insulina. (138, 141, 142, 143, 144)

Se han descrito alteraciones de la ruta biosintética del hemo en DM, aunque sobre todo en DM experimental y en tejido hepático (139, 158, 165, 166, 167, 168).

Por estos tres motivos nos propusimos estudiar la ruta biosintética del hemo en pacientes con DM y en eritrocitos, para lo cual estudiamos dos de las enzimas citoplásmicas que intervienen en esta ruta metabólica. Igualmente, ambas enzimas fueron estudiadas en ratas diabéticas por la administración de estreptozotocina, aunque en este último caso el estudio se realizó en eritrocitos y en tejido hepático.

Los enfermos fueron clasificados en dos tipos de diabetes: Insulino-Dependiente (DMID) y No-Insulino-Dependiente (DMNID).

ENZIMA ALA-D ERITROCITARIA Y HEPATICA

Como reiteradamente comentaremos, en el presente trabajo se ha encontrado inhibida la actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria en todos los pacientes diabéticos, tanto con DMID como con DMNID, comparados con sus respectivos controles (Fig 18).

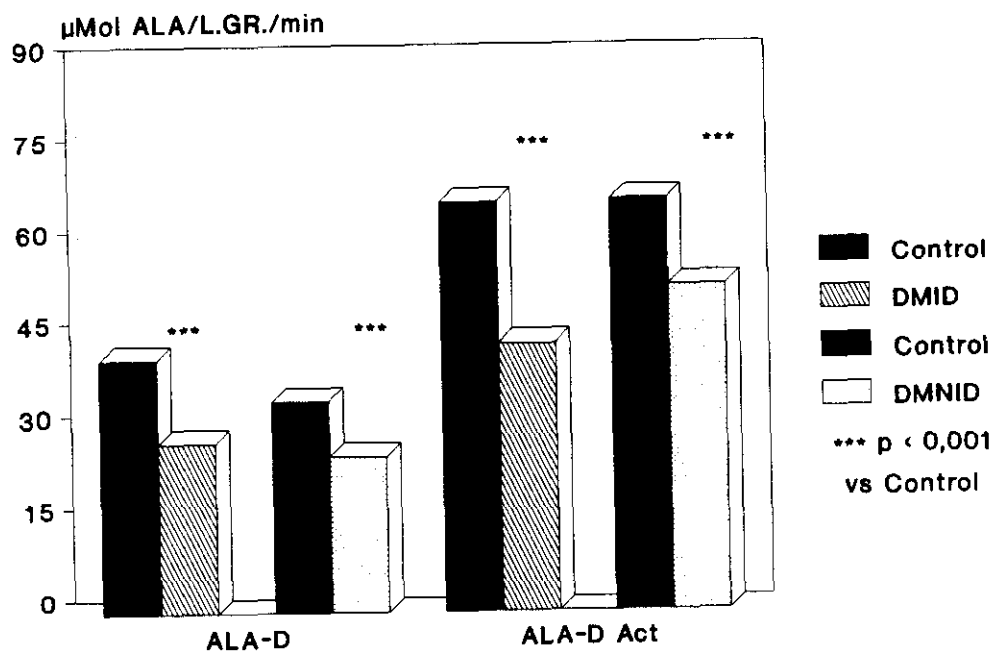


Figura 18: Actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria en enfermos con DMID y DMNID, comparados con sus grupos controles

Llama la atención en la figura 18 la presencia de dos grupos controles; se decidió incluirlos al presentar los pacientes con DMID y DMNID edades diferentes y haber detectado diferencias significativas en los valores de las enzimas de la ruta hemo en una serie de 256 individuos sanos, que fueron estudiados en nuestro laboratorio (Figura 17, pag 52).

También exponemos en la figura 18 los valores de ALA-D activada o estimada. El ALA-D es una enzima sulfhídrica y es inhibida por concentraciones muy bajas de plomo (178), mercurio o cadmio (179). Por este motivo, el método de Fujita y cols utiliza un ambiente rico en agentes reductores e iones metálicos (Zn), lo que facilita un rendimiento óptimo de la enzima que así se correlaciona con la cantidad total presente en los tejidos, valorada por RIA. Por esta causa, cuando la actividad de la enzima ALA-D es determinada según el método de Fujita y cols, podría equipararse a la cantidad total estimada de la enzima en el tejido que se valore.

Los dos tipos de enfermos diabéticos comparados con sus respectivos controles, presentan disminuida la cantidad total estimada de la enzima ALA-D eritrocitaria (**Fig 18**), por lo que es muy probable que también esté descendida su síntesis o acelerada su destrucción.

La actividad de la enzima ALA-D (**Fig 18**) desciende de forma similar en ambos tipos de DM: en los pacientes con DMID el 33% y en los pacientes con DMNID el 26%, comparados con sus respectivos grupos control. Igualmente la cantidad estimada de esta enzima disminuye en proporción semejante en ambos tipos de DM comparados con sus respectivos grupos control; en pacientes con DMID un 35% y en los que

presentan una DMNID un 21%. Parece por tanto que el descenso de la actividad y de la cantidad estimada de la enzima ALA-D no está relacionado con la mayor gravedad del trastorno fisiopatológico en la DMID, ya que en este tipo de diabetes se destruyen casi la totalidad de las células beta de los islotes de Langerhans (87), mientras que en la DMNID se conservan y sólo se aprecia una alteración de la función de las mismas.

Sin embargo, Batlle y col (139) aprecian en su estudio que está disminuida la actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria, respecto al grupo control, solamente en los 10 pacientes con DMID; los otros 10 enfermos con DMNID presentaban una actividad enzimática similar a la del control. Es probable que estas diferencias estén causadas por el número reducido de enfermos que componen sus grupos de estudio; los propios autores señalan la necesidad de ampliar la casuística. En este estudio no se valoró la cantidad estimada de la enzima ALA-D.

Los resultados encontrados en nuestros enfermos diabéticos, se confirman en las ratas diabéticas a las que indujimos DM por la administración de estreptozotocina (STZ). Los animales diabéticos, comparados con el grupo control, muestran una inhibición en la actividad de la enzima ALA-D tanto en eritrocitos (**Fig 19**) como en tejido hepático (**Fig 20**).

Se observa en ambas figuras la presencia de un grupo de animales denominados "inyectados no diabéticos"; se trata de un colectivo que no llegó a desarrollar DM franca, a pesar de haber recibido la misma dosis de STZ que el grupo de ratas diabéticas; la glucemia del grupo de "inyectadas no diabéticas" fue inferior a 250 mg/dl, cifra límite para la mayoría de los autores (130, 131, 174) por encima de la cual las ratas son consideradas diabéticas.

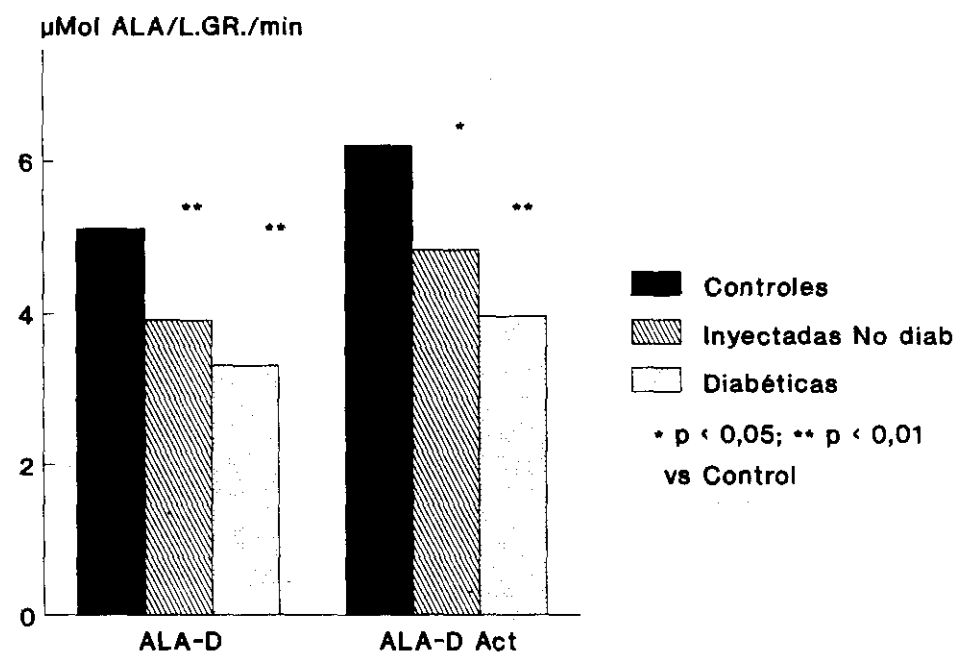


Figura 19: Actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria en ratas diabéticas, "inyectadas no diabéticas" y controles

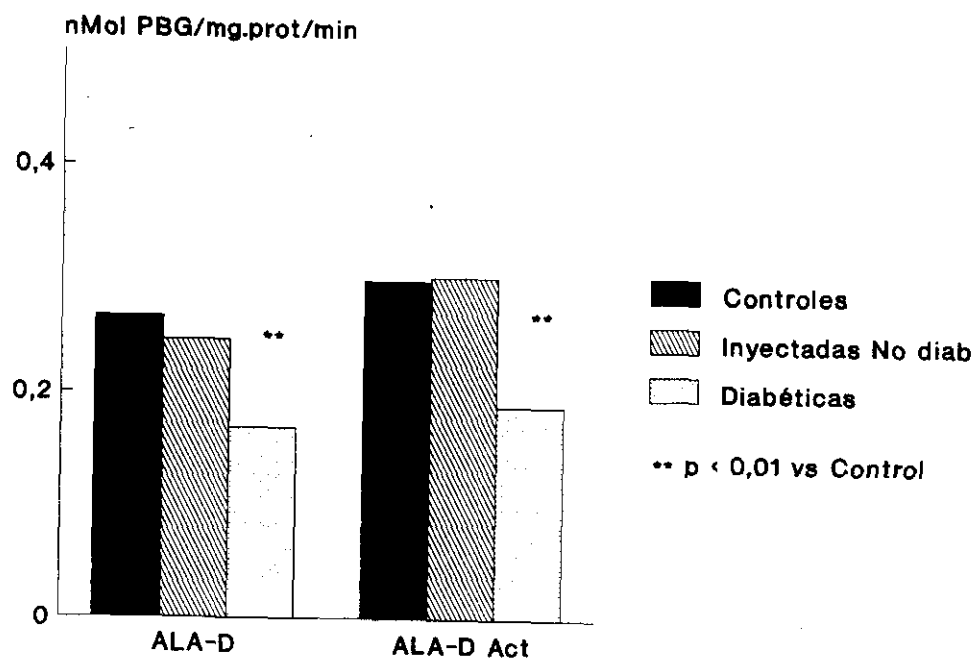


Figura 20: Actividad de la enzima ALA-D hepática en ratas diabéticas, "inyectadas no diabéticas" y controles

La actividad y la cantidad estimada de la enzima ALA-D eritrocitaria están disminuidas, tanto en el grupo diabético como en el "inyectado no diabético", respecto al grupo control (**Fig 19**). Por tanto, no sólo está inhibida la actividad de la enzima ALA-D, sino que al estar descendida la cantidad estimada, es probable que esté inhibida su síntesis o acelerada su destrucción.

Igualmente se observa en la figura 19 que la actividad y la cantidad estimada de la enzima ALA-D eritrocitaria tienden a ser menores en el grupo diabético que en el "inyectado no diabético"; también el grupo diabético es el que muestra mayor alteración del metabolismo hidrocarbonado, lo que sugiere que cuanto mayor es el trastorno de este metabolismo, mayor es el descenso de la actividad y cantidad de la enzima. Parece que ambas alteraciones de actividad y cantidad son independientes de la dosis recibida de STZ, pues los dos grupos recibieron la misma; es más probable que ambas alteraciones enzimáticas estén relacionadas con el trastorno del metabolismo hidrocarbonado que ha originado la STZ.

El grupo de ratas diabéticas tiene inhibida la actividad de la enzima ALA-D en tejido hepático y disminuida la cantidad estimada de esta enzima (**Fig 20**), lo que sugiere que está inhibida su síntesis en este tejido o bien acelerada su destrucción. Sin embargo, el grupo de ratas "inyectadas no diabéticas" presenta una actividad y una cantidad estimada de esta enzima en el mismo tejido similares a las del grupo control (**Fig 20**). Estos datos sugieren que el descenso de la actividad y de la cantidad estimada de la enzima ALA-D en tejido hepático, sólo se producen cuando el trastorno hidrocarbonado es importante, con DM franca; por tanto, tales alteraciones enzimáticas no parecen depender ni de la dosis de STZ, ni del propio fármaco, ya que los dos grupos de ratas recibieron la misma dosis de STZ; sin embargo, la enzimopatía parece estar relacionada con el grado de diabetes que el tóxico produce. De hecho, si consideramos conjuntamente los grupos de ratas diabéticas e "inyectadas no diabéticas", encontramos una relación inversa entre la glucemia final y la actividad de la enzima ALA-D hepática ($r = -0,72$) (**Fig 21**), así como entre la glucemia y la cantidad estimada de la enzima ($r = -0,72$) (**Fig 22**).

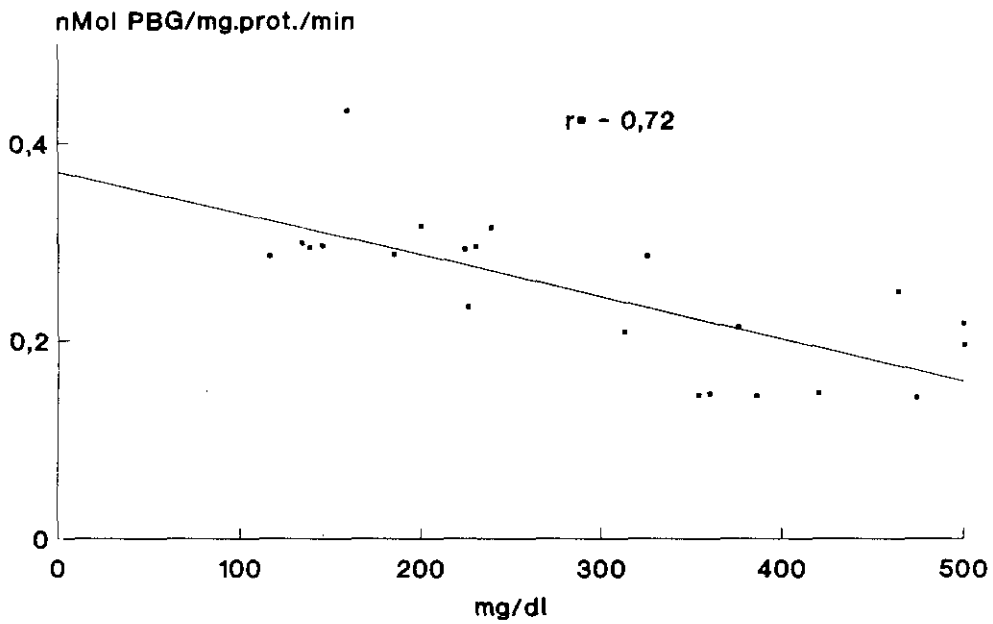


Figura 22: Correlación entre Glucemia (abscisas) y cantidad estimada de ALA-D hepática (ordenadas) en ratas Diabéticas e inyectadas no diabéticas

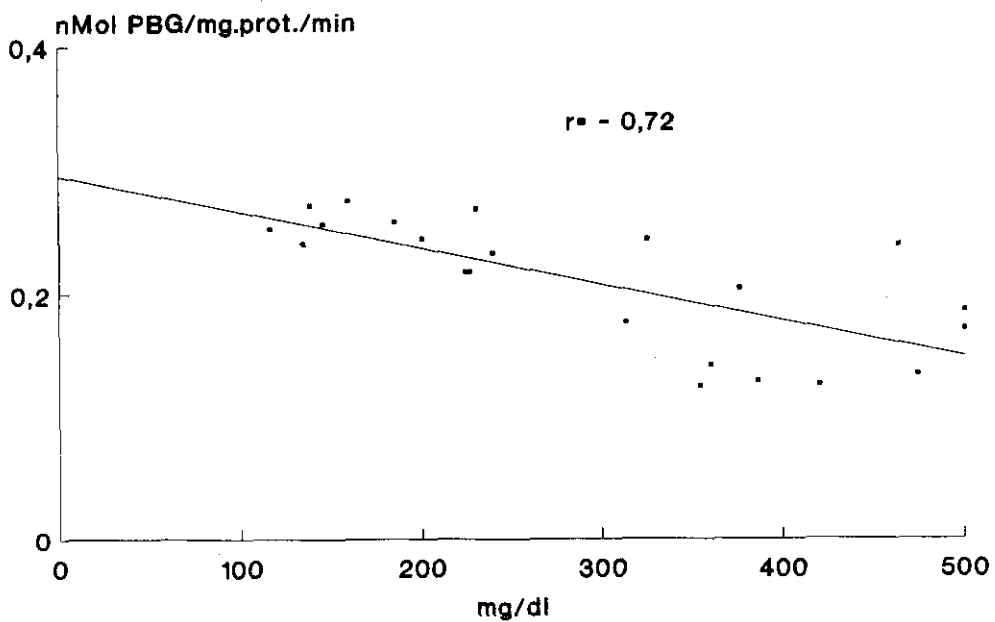


Figura 21: Correlación entre Glucemia (abscisas) y actividad de ALA-D hepática (ordenadas) en ratas Diabéticas e inyectadas no diabéticas

En el grupo de animales inyectados no diabéticos, la enzima ALA-D en eritrocitos está descendida, tanto en actividad como en cantidad estimada; sin embargo, en tejido hepático ambos parámetros son similares a los del grupo control. Estos datos sugieren que la enzima eritroide es más sensible a los trastornos del metabolismo hidrocarbonado que la del tejido hepático y confirman la doble regulación de la ruta biosintética del hemo en tejido hepático y en médula ósea, ya comentada en la introducción de esta tesis (pag 14-16).

La relación que parece existir entre el descenso de la actividad enzimática de ALA-D y la gravedad del trastorno hidrocarbonado, tanto en eritrocitos como en tejido hepático, que ha sido expuesta en este trabajo, también la muestran Rosseti y cols (168) y Bitar y Weiner (157), aunque estos últimos sólo en tejido hepático. Bitar y Weiner (157) observan en el grupo de animales diabéticos que la enzima ALA-D hepática aumenta su actividad hasta casi alcanzar la del control cuando estos animales son tratados con insulina y su glucemia desciende hasta una cifra próxima a la del grupo control. En nuestro estudio, no fue posible administrar insulina a las ratas diabéticas ya que los animales también formaban parte de otro trabajo que se hubiera alterado si los animales hubiesen recibido insulina.

El descenso de la actividad enzimática de ALA-D hepática, es más acusado en el estudio de Bitar y Weiner (54%) que el encontrado en nuestro trabajo (35,5%); ésto puede estar causado por la relación entre la actividad de la enzima ALA-D y la gravedad del trastorno hidrocarbonado, pues la glucemia media de las ratas diabéticas de estos autores (547 mg/dl) fue mayor que la de los animales de nuestro trabajo (406 mg/dl).

ENZIMA PBG-D ERITROCITARIA Y HEPATICA

La actividad de la enzima PBG-D en eritrocitos se encuentra aumentada tanto en enfermos de DMID como de DMNID, comparados con sus respectivos controles (**Fig 23**). El incremento es similar en ambos tipos de diabetes.

La enzima PBG-D cataliza la formación de hidroximetilbilano a partir de cuatro moléculas de PBG; estas cuatro moléculas se obtienen previamente por medio de una reacción catalizada por la enzima ALA-D.

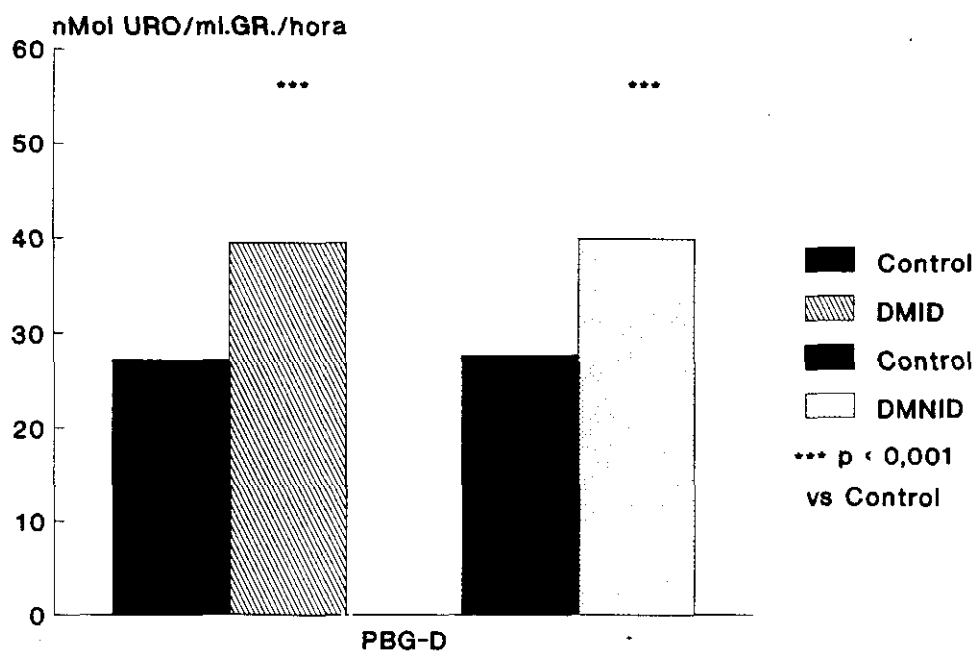


Figura 23: Actividad de la enzima PBG-D eritrocitaria en controles, enfermos con DMID y con DMNID

En la DM, la enzima ALA-D se encuentra inhibida y por tanto la cantidad de PBG formado podría verse disminuida; es probable que el aumento de la actividad enzimática de PBG-D intente compensar la hipoactividad de la enzima ALA-D. El organismo está dotado de un notable exceso de esta enzima que, por tanto, no resulta limitante de la cuantía y velocidad de la ruta metabólica del hemo.

Batlle y cols (139) estudiaron la actividad de la enzima PBG-D en dos grupos de 10 pacientes con DMID y con DMNID; compararon ambas actividades entre si y con la del grupo control y no encontraron diferencias significativas. Estos autores incluyeron en su trabajo grupos con escaso número de enfermos, tal vez por ello difieran sus resultados y los nuestros.

Nuestras ratas diabéticas, comparadas con el grupo control, presentan un aumento de la actividad enzimática de PBG-D en tejido hepático, mientras que sólo tiende a incrementarse en eritrocitos (**Fig 24**). Sin embargo, en el grupo de animales "inyectados no diabéticos", la actividad de la enzima PBG-D es similar a la del grupo control tanto en tejido hepático como en eritrocitos (**Fig 24**).

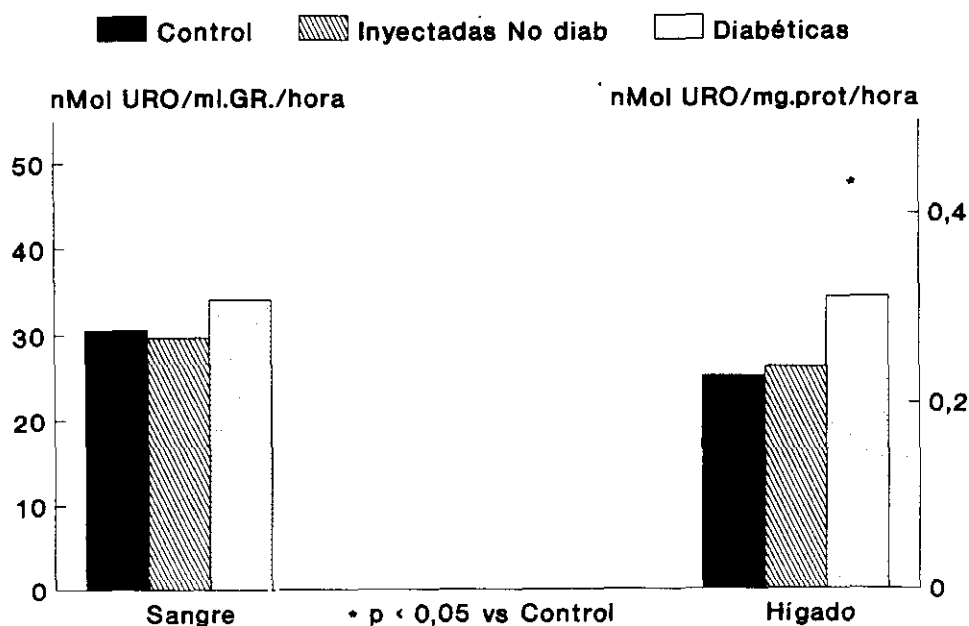


Figura 24: Actividad de la enzima PBG-D en sangre e hígado en ratas diabéticas e "inyectadas no diabéticas" y controles

Es probable que el incremento en la actividad de la enzima PBG-D hepática intente compensar la hipoactividad de la enzima ALA-D; por tanto parece que su control es más sensible que el que rige a esta misma enzima PBG-D en eritrocitos, ya que también en éstos está descendida la actividad de la enzima ALA-D y sin embargo no aumenta la actividad de la enzima PBG-D.

Las diferencias que hemos encontrado en la actividad de la enzima PBG-D en eritrocitos y en tejido hepático, ponen de nuevo de manifiesto el distinto control de la ruta biosintética del hemo en médula ósea y en tejido hepático, como ya expusimos en la introducción de esta tesis (pag 14-16).

ALTERACIONES DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO EN LOS GRUPOS TERAPEUTICOS DE DMNID.-

La DMID tiene un comienzo brusco, debido a la destrucción casi completa de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas (87); por tanto, la alteración de la función pancreática es similar desde el comienzo de la enfermedad. Los pacientes requieren tratamiento con insulina prácticamente desde el inicio de la diabetes.

Los pacientes con DMNID conservan las células beta de los islotes pancreáticos pero sufren una disfunción que produce alteraciones en la cuantía y en la pulsatilidad de la secreción de insulina (122). Los enfermos pueden requerir únicamente tratamiento dietético y/o hipoglucemiantes orales y/o insulina.

La terapia recibida por los pacientes de DMNID podría indicar la importancia de la alteración en la función beta pancreática. Por este motivo, en el presente trabajo, los pacientes de DMNID fueron clasificados según el tratamiento recibido: sólo dieta hipoglucemiante, dieta y sulfonilurea o dieta e insulina.

Aunque la actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria se encuentra inhibida en los tres grupos terapéuticos comparados con el grupo control (**Fig 25**), el grado de inhibición es similar en los tres grupos terapéuticos de pacientes con DMNID. La cantidad estimada de la enzima en los hematíes (ALA-D Act) está igualmente disminuida (**Fig 25**), aunque de forma semejante en los tres grupos terapéuticos comparados con el grupo control.

La actividad de la enzima PBG-D eritrocitaria se encuentra incrementada en los tres grupos terapéuticos, respecto al grupo control (**Fig 25**); sin embargo este aumento es mayor en los pacientes tratados con insulina (54%) o sulfonilurea (50%) que en los que reciben únicamente dieta (19%).

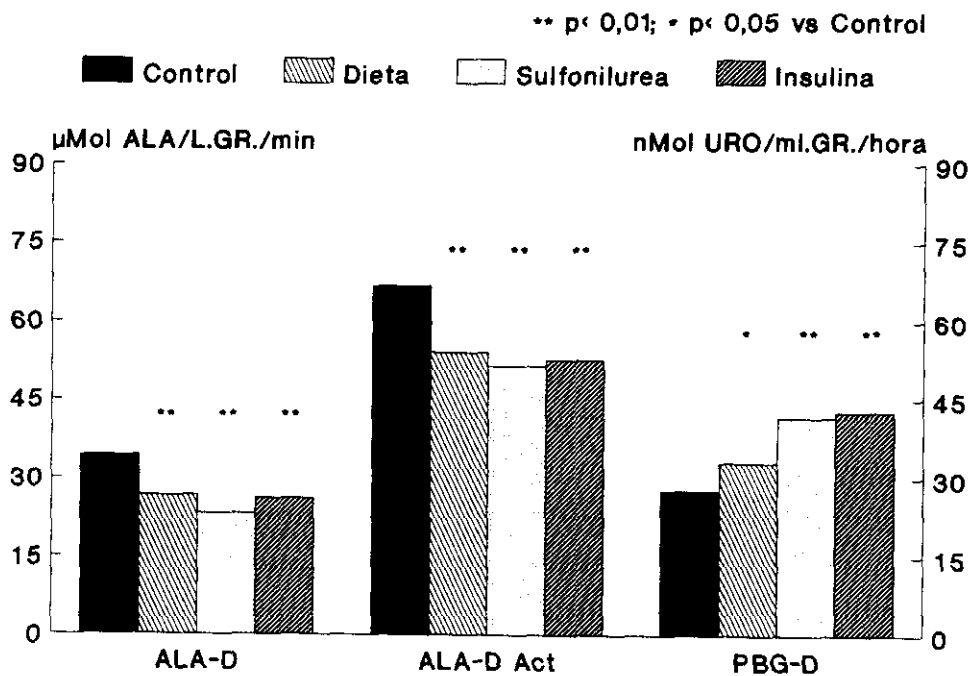


Figura 25: Actividad de las enzimas de la ruta del hemo en los enfermos de los 3 grupos terapéuticos de DMNID y el grupo control

Aunque es probable que la función beta pancreática esté más alterada en los grupos tratados con insulina o sulfonilurea, las diferencias entre los tres grupos terapéuticos son mínimas, tanto en la actividad como en la cantidad estimada de la enzima ALA-D eritrocitaria. Una posible explicación puede residir en el control del metabolismo hidrocarbonado por la terapia recibida por los pacientes. En la DM experimental el tratamiento con insulina disminuyen las alteraciones detectadas en la ruta biosintética del hemo en tejido hepático (157).

Así, Canepa y cols (174) describen que la clorpropamida es capaz de inducir la enzima ALA-S en hepatocitos cultivados procedentes de ratas diabéticas. Esta enzima es clave para el control de la ruta biosintética del hemo; si está inducida, también lo está esta ruta metabólica. La clorpropamida es una sulfonilurea y aunque ninguno de los pacientes incluidos en nuestro trabajo la ha recibido como terapia, si que han sido tratados con otras sulfonilureas: glibenclamina y glipizida.

Parece por tanto, que las alteraciones detectadas en las enzimas de la ruta hemo en los tres grupos terapéuticos de DMNID no se relacionan con la gravedad de la alteración fisiopatológica que causa la DM.

RELACION ENTRE EL CONTROL DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO EN D.M. Y LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO.-

Rose y cols (147) describieron por primera vez la influencia de los hidratos de carbono en la biosíntesis del hemo y lo denominaron "efecto glucosa"; estos autores administraban a sus ratas aliliso-propil-acetamida (AIA), producto capaz de originar una porfiria aguda intermitente en animales y por tanto, aumento de la cantidad de porfobilinógeno en orina. Rose y cols comprobaron que si las ratas eran alimentadas sólo con dextrina, desaparecía la porfobilinogenuria, mientras que únicamente se reducía si los animales eran alimentados sólo con caseína.

Donald y cols (148) muestran que el AIA actúa induciendo la enzima ALA-S hepática; estos autores describen que sus ratas tratadas con AIA y alimentadas sólo con sacarosa presentan un descenso de la actividad de la enzima ALA-S hepática hasta alcanzar la normalidad y corrección de la porfobilinogenuria.

Bonkowsky y cols (149) observan el "efecto glucosa" en sus ratas y comprueban que es dosis-dependiente; por tanto, el descenso de la inducción de la enzima ALA-S hepática en respuesta a AIA es mayor al aumentar la cantidad de glucosa administrada. Igualmente, estos autores indujeron DM por la administración de halloxano en un grupo de ratas que posteriormente recibieron AIA; la inducción de la enzima ALA-S hepática que presentaba este grupo era menor que la del grupo control, tratado únicamente con AIA, sin embargo, la inducción enzimática era similar a la presentada por otro grupo de animales a los que se administró glucosa y AIA. Estos autores concluyen que la administración de glucosa y la inducción de DM disminuyen de forma similar la inducción de la enzima ALA-S hepática por AIA.

Muy diversos autores, entre ellos Doss y Verspohl (145), han comunicado que la administración de glucosa intravenosa producía mejoría clínica y bioquímica de las crisis agudas de la porfiria intermitente aguda.

Todos estos trabajos se refieren a la influencia de la glucosa sobre la ruta biosintética del hemo previamente estimulada o alterada. Sin embargo, son escasos los estudios sobre la posible influencia de la glucosa en esta ruta metabólica en estado basal, tanto en animales sanos como con DM, ya sea inducida o genética.

En nuestra experiencia, los pacientes con DMID y mayor glucemia tienden a presentar menor actividad y cantidad estimada de la enzima ALA-D, mientras que la actividad de la enzima PBG-D tiende a aumentar (**Fig 26**). Así mismo observamos una débil relación inversa ($r = -0,36$) entre el valor glucémico y la actividad de la enzima ALA-D.

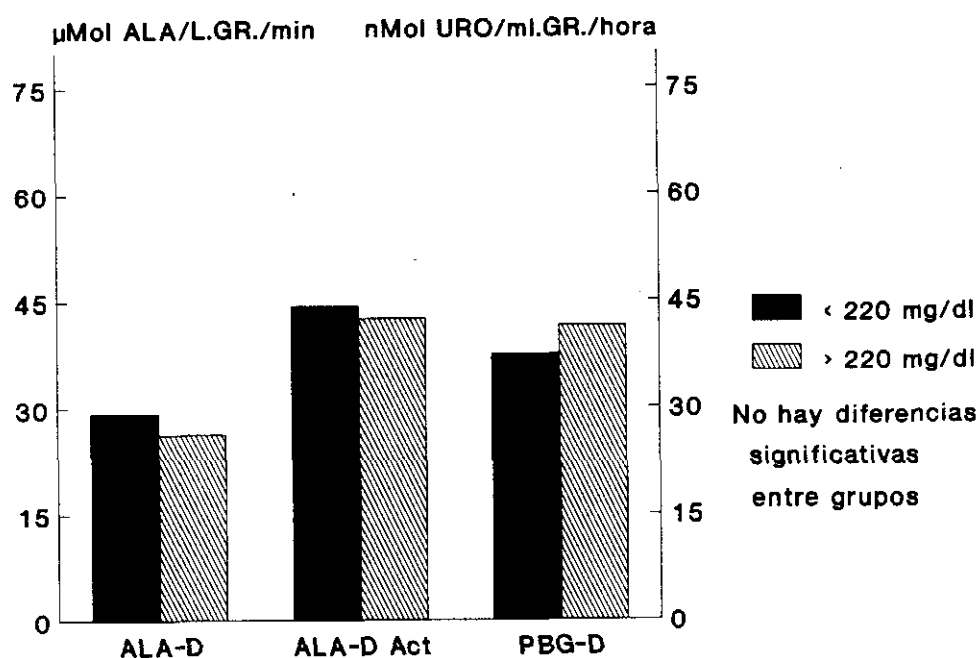


Figura 26: Actividad de las enzimas de la ruta del hemo en enfermos con DMID clasificados por el percentil 50 de Glucemia

Por otro lado, los enfermos con DMNID y mayor glucemia presentan menor actividad de la enzima ALA-D, menor cantidad estimada (ALA-D Act), aunque la actividad de la enzima PBG-D sólo tiende a incrementarse (**Fig 27**). También encontramos sendas relaciones inversas, aunque débiles, entre el valor glucémico y la actividad de la enzima ALA-D ($r = -0,26$), así como entre la cantidad estimada de esta última enzima y la glucemia ($r = -0,29$).

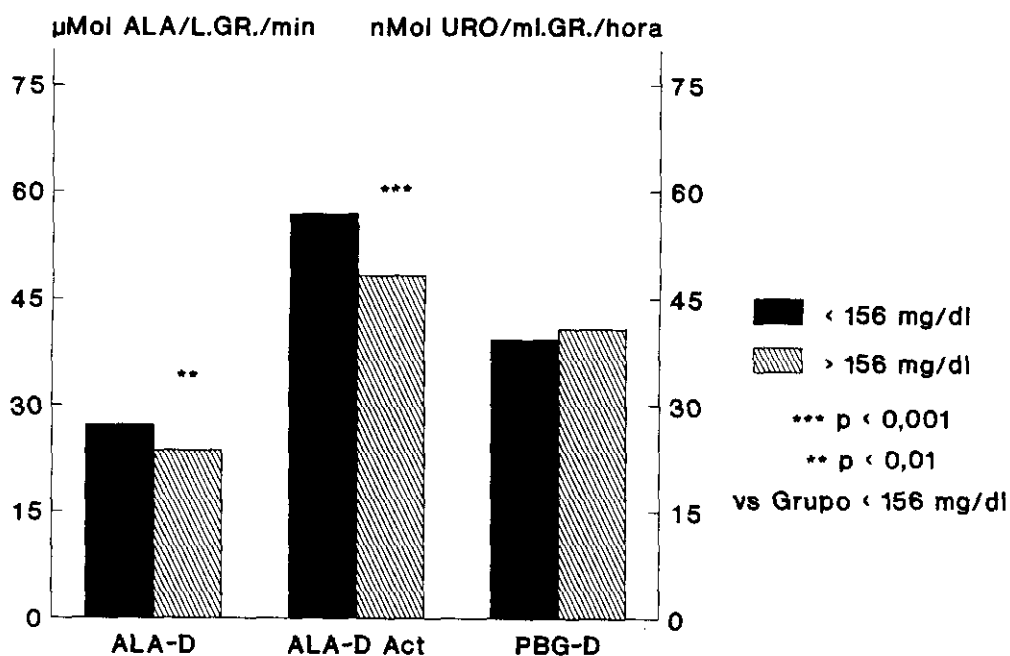


Figura 27: Actividad de las enzimas de la ruta del hemo en enfermos con DMNID, clasificados por el percentil 50 de la glucemia

Si se considera el global de pacientes diabéticos, DMID y DMNID, encontramos una débil relación inversa entre la cifra de glucemia y la actividad de la enzima ALA-D ($r = -0,20$).

Batlle y col (139) en su escasa casuística no encontraron ninguna relación entre la glucemia y la actividad de la enzima ALA-D o PBG-D, tanto en pacientes con DMID, como con DMNID. Sin embargo, un estudio posterior de estos mismos autores (172) señala una correlación negativa significativa entre la actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria y los valores de glucemia.

Una vez estudiada la influencia del valor puntual de la glucemia en la ruta del hemo y en los dos tipos de diabetes, sería aconsejable observar en esta misma ruta la influencia del valor medio glucémico. El porcentaje de HbA1 indica el nivel medio de glucemia en las 4-8 semanas previas al estudio. Para Nathany y cols (97), la correlación entre el porcentaje de HbA1 y la glucemia media es 0,958.

Los pacientes con DMID y mayor porcentaje de HbA1 aunque presentan menor actividad de la enzima ALA-D, su cantidad total estimada sólo tiende a descender, mientras que la actividad de la enzima PBG-D tiende a incrementarse (**Fig 28**). Así mismo, también observamos una débil relación inversa entre el porcentaje de HbA1 y la actividad de la enzima ALA-D ($r = -0,51$) y otra débil relación directa entre este porcentaje y la actividad de la enzima PBG-D ($r = 0,36$).

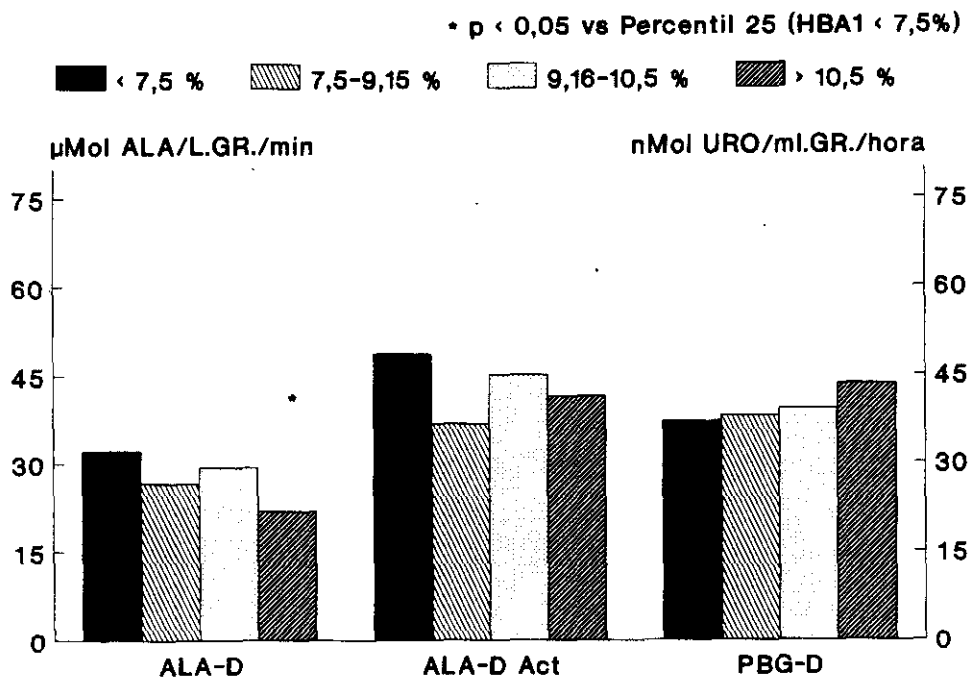


Figura 28: Actividad de las enzimas de la ruta del hemo en enfermos con DMID, clasificados por cuartiles de HbA1

Sin embargo, en los enfermos con DMNID y mayor porcentaje de HbA1, la actividad de la enzima ALA-D sólo tiende a disminuir mientras que su cantidad total estimada está disminuida y la actividad de la enzima PBG-D no sufre modificaciones (Fig 29).

Si se considera el global de pacientes diabéticos, DMID y DMNID, existe una débil relación inversa entre el porcentaje de HBA1 y la actividad de la enzima ALA-D ($r = -0,34$)

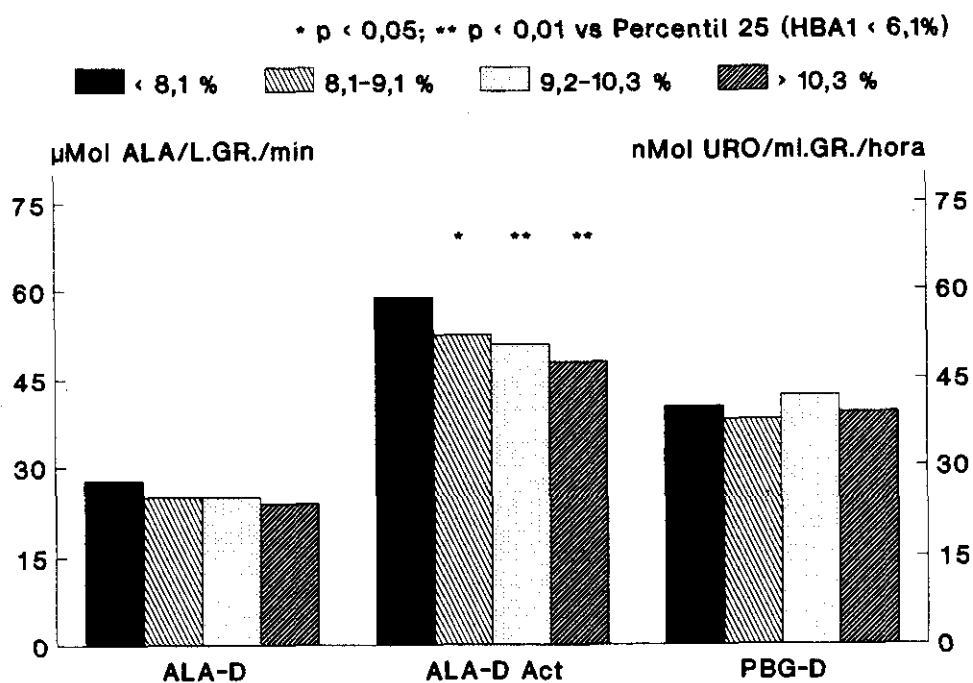


Figura 29: Actividad de las enzimas de la ruta del hemo en enfermos con DMNID, clasificados por los cuartiles de HBA1

Estos datos sugieren que los pacientes con DMID presentan una ruta biosintética del hemo más sensible a los valores medios de glucemia que a los valores concretos, mientras que en los enfermos con DMNID, ocurre lo contrario. De cualquier manera, en la DMID el control del metabolismo hidrocarbonado es más difícil y la glucemia media suele ser más elevada que en DMNID; la causa está en que la DMID sufre una destrucción casi completa de las células beta pancreáticas y la reserva de insulina es mínima o inexistente.

Tal vez los elevados niveles de glucemia sean los causantes por sí mismos de las alteraciones descritas en la ruta biosintética del hemo, en ambos tipos de DM Milad y Weiner en 1984 (157) sugieren que la inhibición de la actividad enzimática de ALA-D hepática que se produce en su grupo de ratas diabéticas, podría estar causada por la propia glucosa o sustancias similares. Battle y cols (172) consideran que la hipoactividad de la enzima ALA-D observada en la DM humana y experimental puede ser debida a la glicosilación de la enzima. Sin embargo estos autores también aprecian inhibida la enzima PBG-D, dato que contrasta con nuestros hallazgos.

La importancia de la glucemia como agente causal de las alteraciones encontradas en la ruta del hemo, debería ser confirmada en estudios en pacientes diabéticos en situaciones extremas de coma cetoacidótico o hiperosmolar. Igualmente sería interesante observar la evolución de la actividad de la enzima ALA-D una vez superada tal situación crítica. Igualmente se podría realizar determinaciones seriadas de actividad y cantidad estimada de la enzima ALA-D eritrocitaria, valores glucémicos y porcentaje de HbA1, para valorar la relación entre los tres parámetros.

Otra explicación posible a las alteraciones de la ruta hemo en la DM, podría deducirse de las observaciones de Murakami y cols (187); estos

autores muestran un descenso de la cantidad total de glutatión, con descenso de su forma reducida, en los eritrocitos de enfermos con DMNID. El glutatión es un tripéptido presente en casi todas las células del organismo y su función fundamental es proteger los grupos sulfhídricos de la célula y regular su ambiente redox previniendo el daño por oxidación. Por tanto, los eritrocitos de los enfermos diabéticos presentan un predominio de agentes oxidantes y sus grupos sulfhídricos no están protegidos, ambos factores son necesarios para el buen rendimiento de la enzima ALA-D.

Completando esta observación, McLennan y cols (188) describieron similares alteraciones del glutatión en tejido hepático en un grupo de ratas diabéticas. Estas alteraciones se corregían cuando los animales recibían insulina.

Aunque los hallazgos de Murakami y cols (187) y McLennan y cols (188) justificarían el descenso de la actividad enzimática de ALA-D eritrocitaria y hepática en la DM, no explican el descenso observado de la cantidad total estimada de la enzima, ya descrito en este trabajo.

INFLUENCIA DE LA EDAD, TIEMPO DE EVOLUCION, SEXO Y SUPERFICIE CORPORAL EN LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO Y EN EL METABOLISMO HIDROCARBONADO DE PACIENTES CON DMID Y DMNID.-

En nuestros pacientes con DMID, cuanto mayor es su edad tiende a ser menor la actividad de la enzima ALA-D y es menor cuando aumenta el tiempo de evolución. Sin embargo, en la DMNID la actividad de esta enzima prácticamente no se modifica con ninguno de estas dos variables (Fig 30 y 31).

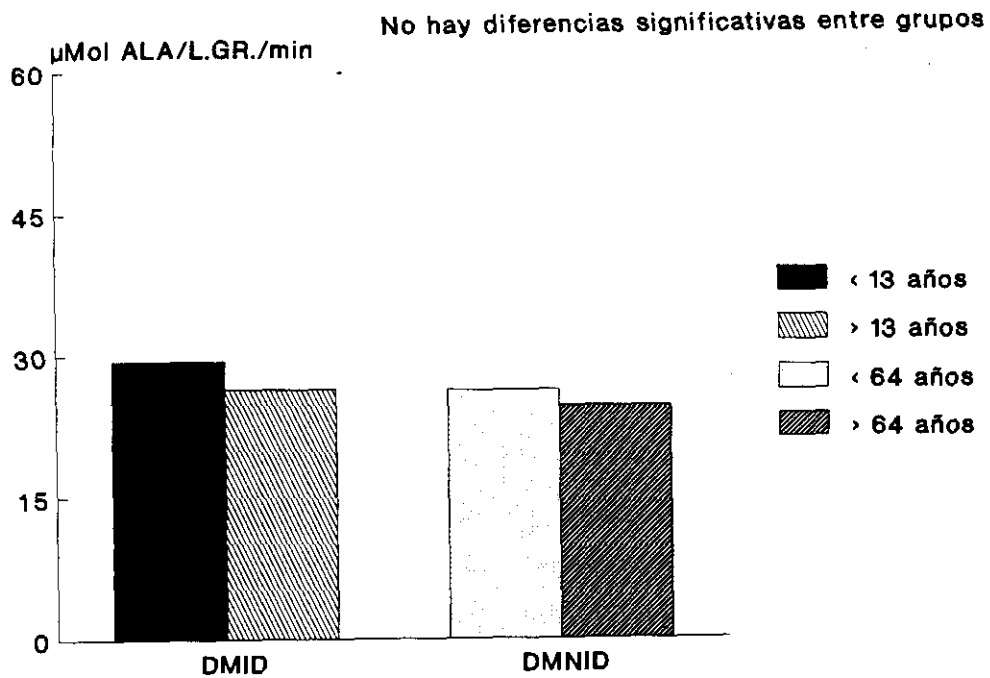


Figura 30: Actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria en enfermos con DMID y DMNID, clasificados por el percentil 50 de la EDAD

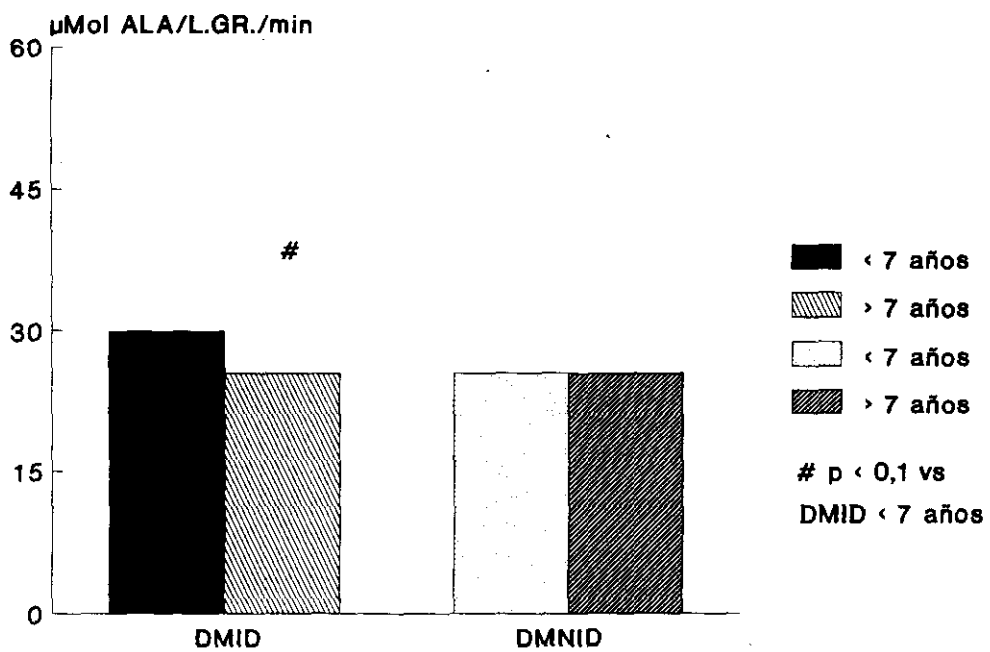


Figura 31: Actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria en enfermos con DMID y DMNID, clasificados por el percentil 50 de la EVOLUCION

Los pacientes con DMID que presentan más edad o mayor tiempo de evolución, también presentan peor control del metabolismo hidrocarbonado; este peor control podría explicar la tendencia a disminuir de la enzima ALA-D, descrita en estos enfermos (Fig 32 y 33).

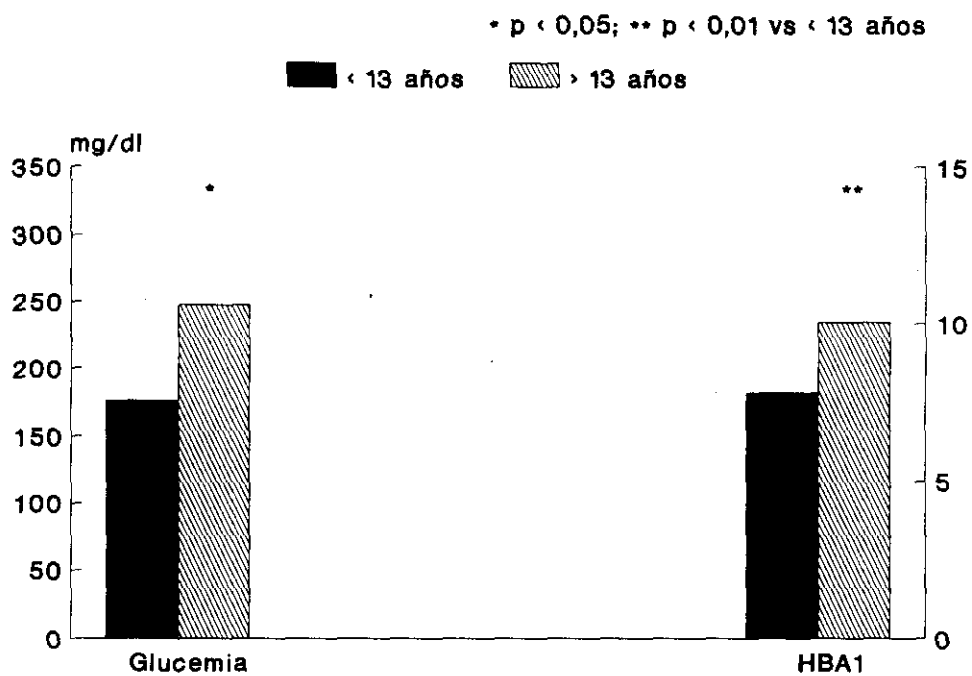


Figura 32: Glucemia y porcentaje de HBA1 en enfermos con DMID clasificados por el percentil 50 de la EDAD

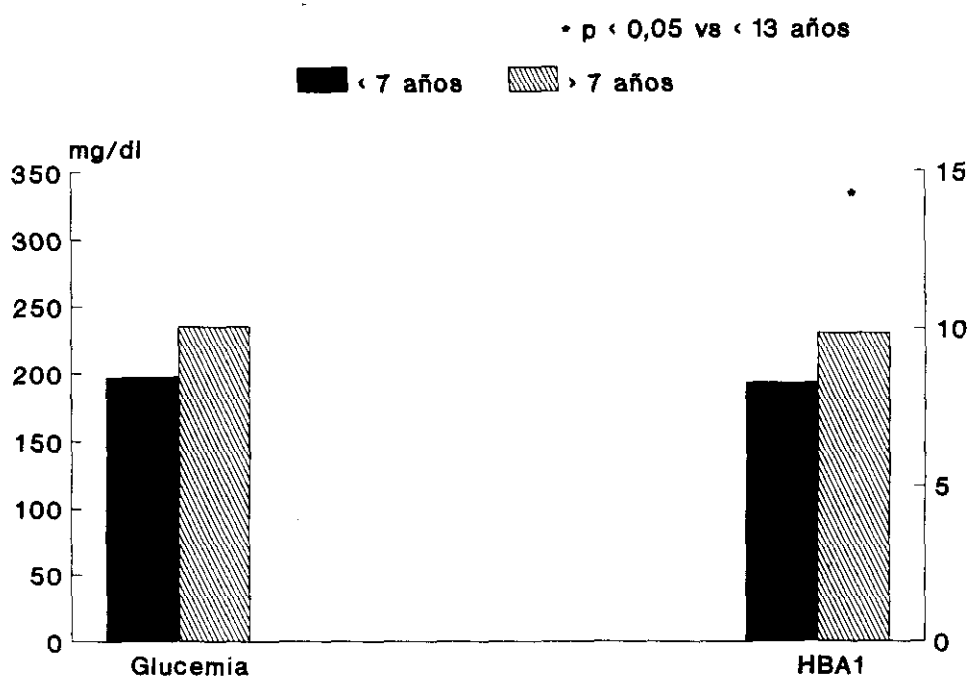


Figura 33: Glucemia y porcentaje de HBA1 en enfermos con DMID clasificados por el percentil 50 de la EVOLUCION

No parece que la superficie corporal se relacione con modificaciones de las enzimas de la ruta hemo, tanto en la DMID (Tabla VIII-3, pag 77), como en la DMNID (Tabla XXVIII, pag 92).

Tampoco el sexo influye en las enzimas de la ruta hemo en la DMID (Fig 34), aunque hay que tener presente que en la mayoría de nuestros casos se trata de niñas. Sin embargo, en la DMNID las mujeres presentan mayor actividad de las enzimas ALA-D y PBG-D que los varones (Fig 35) y ello a pesar de que su control del metabolismo hidrocarbonado es peor, con cifras más elevadas de glucemia y del porcentaje de HbA1 que los varones.

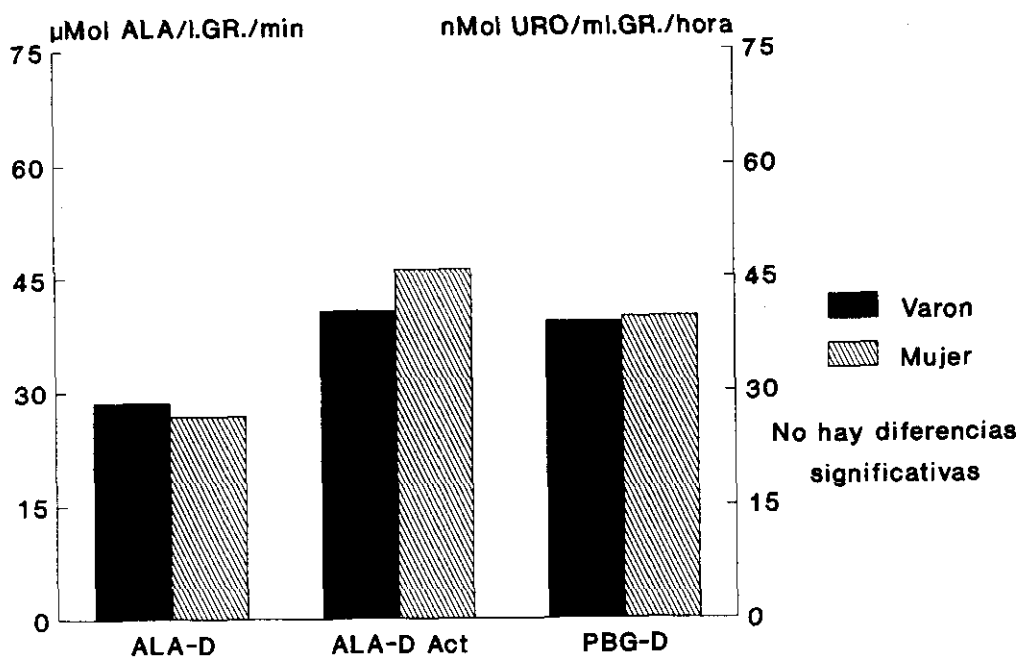


Figura 34: Enzimas de la ruta del hemo en ambos SEXOS y enfermos con DMID

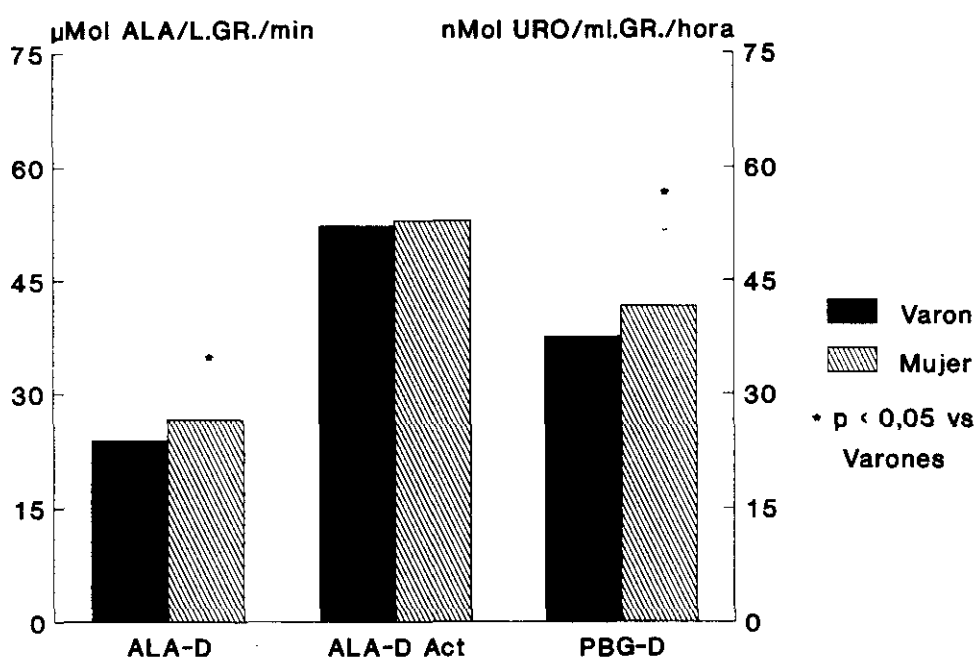


Figura 35: Enzimas de la ruta del hemo en ambos SEXOS de enfermos con DMNID

INFLUENCIA DE LA SIDEREMIA Y FERRITINEMIA EN LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO EN LA DMNID.-

La mayor parte del hierro del organismo se encuentra en forma de hemoglobina en los hematíes, cantidades más pequeñas se encuentran en otros tejidos como mioglobina o enzimas hémicas. El exceso de hierro se almacena como ferritina y hemosiderina en los fagocitos del bazo, hígado y médula ósea, así como en el parénquima hepático (189).

La ferritina sérica se correlaciona con los almacenes corporales totales de hierro. Pero las concentraciones de ferritina sérica no sólo dependen de estos almacenes, también de su liberación tisular. Por este motivo, si hay una lesión tisular extensa, como hepatopatía, o un proceso neoplásico, el valor de la ferritina sérica se eleva sin que exista realmente sobrecarga de hierro (189).

En la presente tesis se excluyó a los pacientes cuyas cifras de hierro o ferritina séricas se encontraban fuera de los valores de referencia del laboratorio central del Hospital Clínico de San Carlos (**Tabla XIX, Pag 87**).

Por otro lado, ya se expuso en la introducción de esta tesis que ciertas anemias pueden cursar con alteraciones de la ruta hemo y además suelen presentar modificaciones de la sideremia y/o ferritinemia. Así, la anemia sideroblástica congénita puede presentar inhibición de la enzima ALA-S eritroide (62), la anemia ferropénica elevación de la protoporfirina en hematíes (58) y la anemia hemolítica elevación de la actividad enzimática de PBG-D (63).

Fueron excluidos de nuestro trabajo cuatro pacientes, dos presentaban valores elevados de ferritina sérica y elevación de las cifras de transaminasas (GOT, GPT y gammaGT) y los otros dos, con valores bajos de hierro y ferritina sérica, mostraban cifras bajas de hemoglobina.

De los 99 enfermos con DMNID, sólo fue posible determinar sideremia y ferritina sérica a 87; ambos parámetros se encuentran relacionados de forma positiva ($r = 0,37$) en nuestro trabajo. Observamos que la actividad de la enzima ALA-D era menor al aumentar la sideremia (**Fig 36**) o ferritinemia (**Fig 37**) de los pacientes, también su cantidad total estimada era menor al elevarse la ferritina sérica y tendía a descender cuando se incrementa la sideremia. La actividad de la enzima PBG-D no sufría modificaciones.

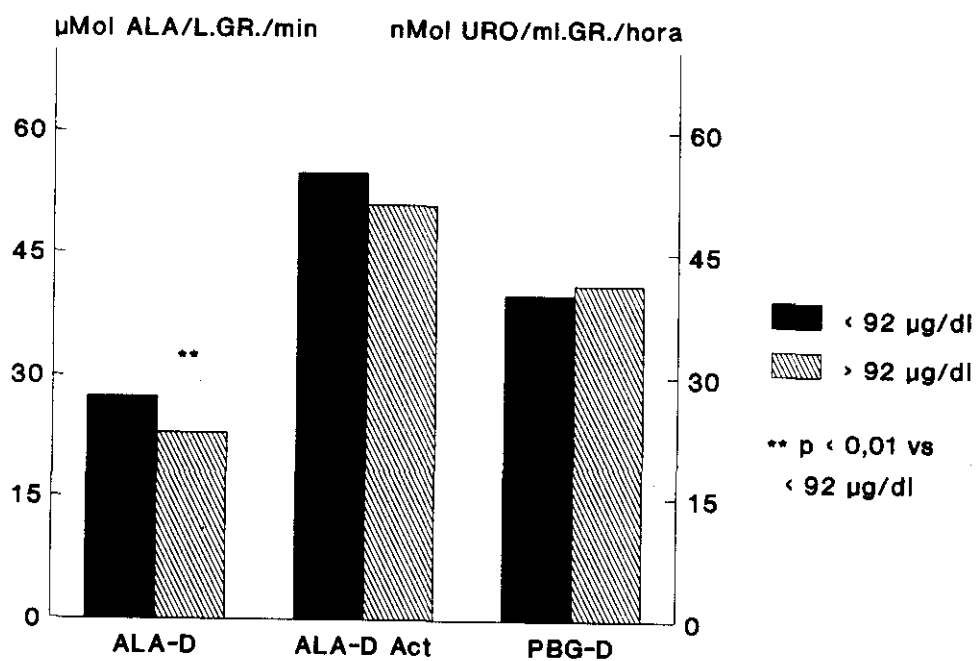


Figura 36: Enzimas de la ruta del hemo en pacientes con DMNI clasificados por el percentil 50 de la SIDEREMIA

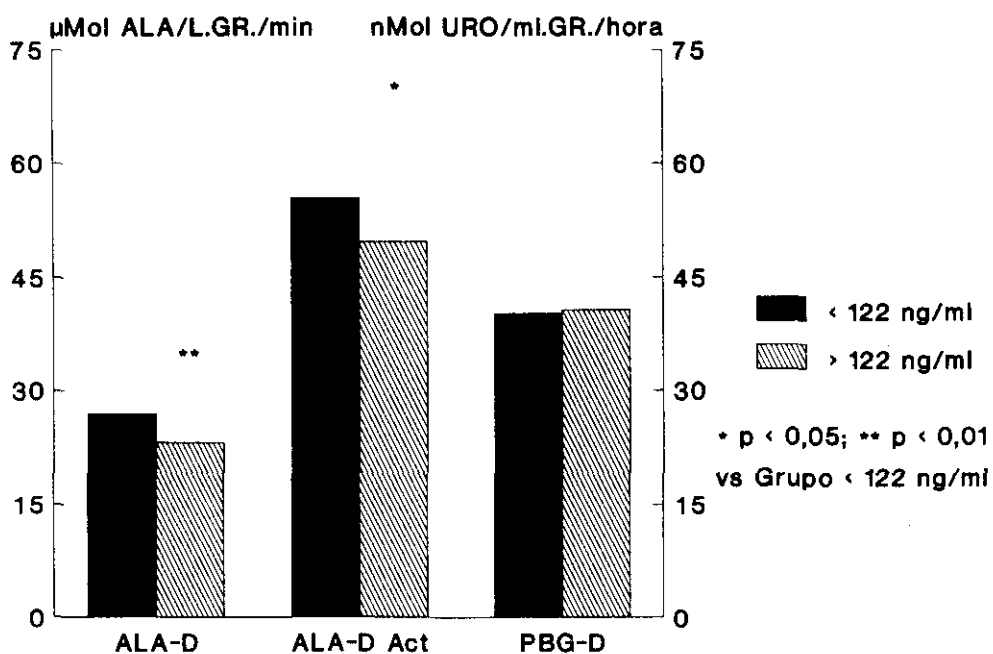


Figura 37: Enzimas de la ruta del hemo en pacientes de DMNID clasificados por el percentil 50 de su FERRITINEMIA

El hierro, en forma de ion ferroso, interviene como substrato en el último paso de síntesis del hemo; la enzima ferroquelatasa lo inserta en la molécula de protoporfirina IX y se forma el grupo prostético hemo. Se han descrito varios efectos del hierro sobre el metabolismo del hemo (190):

1/ Potenciar la inducción de la enzima ALA-S, mediada por drogas como la alilisopropilacetamida; la enzima ALA-S cataliza el primer paso en la síntesis de hemo (191, 192).

2/ Disminuir la actividad de la enzima ALA-D, segundo paso de esta ruta (193, 194).

3/ Disminuir la descarboxilación de uroporfirinógeno a coproporfirinógeno, paso catalizado por la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa (193).

4/ Inducir la enzima hemo-oxigenasa, que es fundamental en el catabolismo del hemo (192, 195).

Estos efectos ejercidos por el hierro en la biosíntesis del hemo se han descritos en trabajos realizados en animales de experimentación, únicamente en tejido hepático; los animales eran sometidos a una sobrecarga de hierro, bien con una sólo dosis intraperitoneal (193) o bien con varias dosis orales de hierro-carbonilo; esto último provocaba una alteración similar a la hemocromatosis humana (194). En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio con ratas a las que se administró de forma continuada hierro dextrano y hierro carbonilo, también se encontró descendida la actividad de la enzima ALA-D en tejido hepático, mientras que la actividad de la enzima URO-D hepática sólo descendía si los animales recibían al mismo tiempo hexaclorobenzeno (196).

En nuestro trabajo se confirma lo referido en estudios previos realizados en roedores, ya que los pacientes diabéticos con mayor sideremia y/o ferritinemia, a pesar de encontrarse dentro de los límites normales, presentan mayor inhibición de la actividad y descenso en la cantidad estimada de la enzima ALA-D. Así mismo, se aprecia una débil, pero significativa relación inversa ($r = -0,28$) entre la actividad de esta enzima y la sideremia.

Los diabéticos con mayor hierro o ferritina sérica mostraron edad, tiempo de evolución de la enfermedad y datos de control del metabolismo hidrocarbonado, similares al grupo con menor tasa de hierro o de ferritina séricos.

Cuando se clasifica a los enfermos con DMNID en tres grupos terapéuticos, se observa que cuanto mayor es la sideremia o la ferritina sérica tiende a disminuir la actividad y cantidad estimada de la enzima ALA-D (Fig 38 y 39).

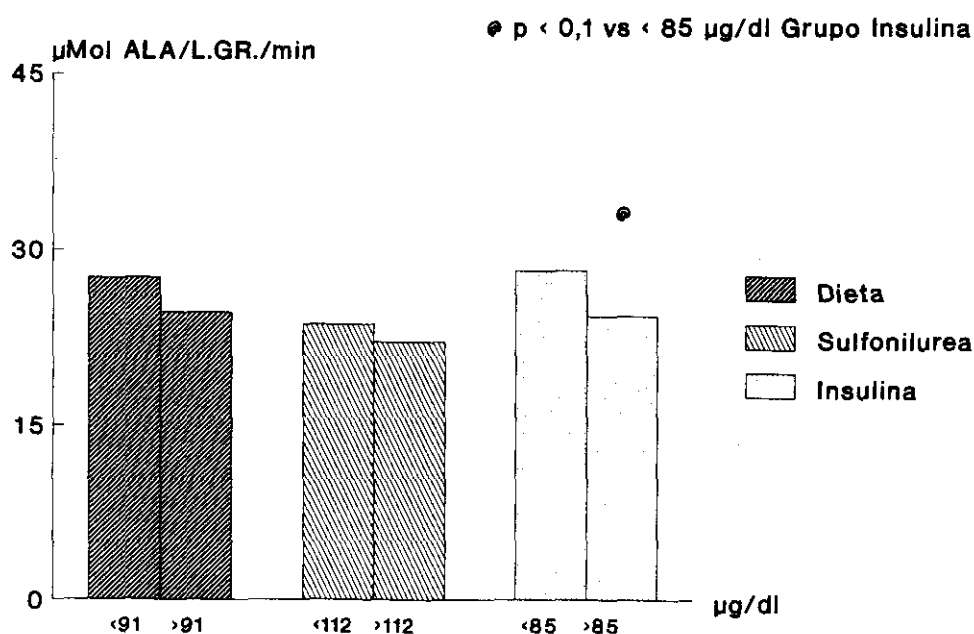


Figura 38: Actividad de la enzima ALA-D en los enfermos de los 3 grupos terapéuticos de DMNID, clasificados por el P50 de SIDEREMIA

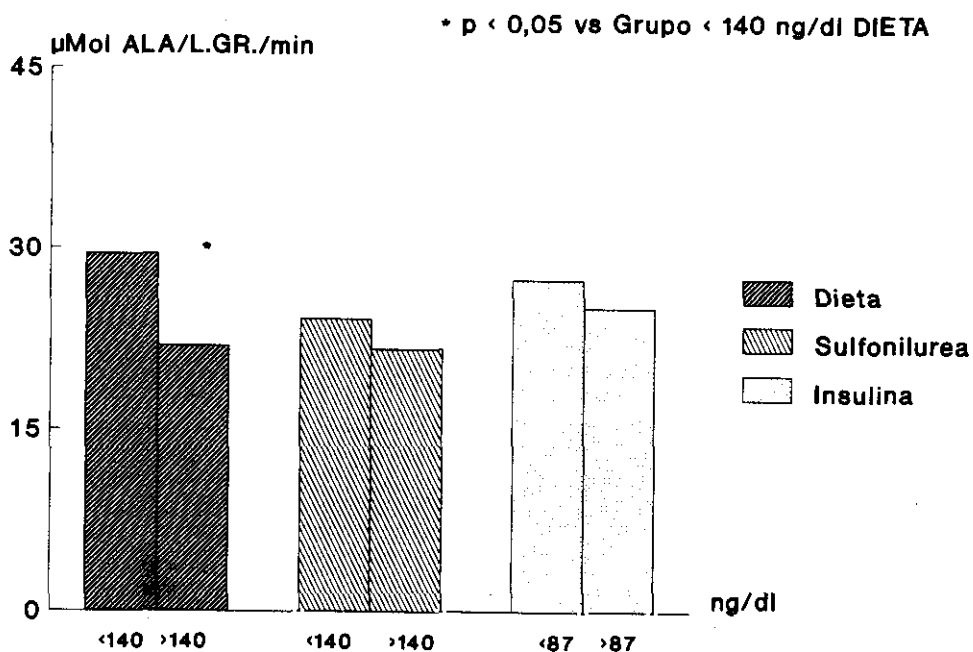


Figura 39: Actividad de la enzima ALA-D en los tres grupos terapéuticos de DMNID, clasificados por el P50 de FERRITINEMIA

Llama la atención que el grupo tratado con sulfonilurea, que es el que presenta cifras más elevadas de sideremia y ferritina sérica (**Tabla XIX, pag 87**), también tiende a mostrar menor actividad y cantidad estimada de la enzima ALA-D que los otros dos grupos terapéuticos (**Fig 25**). Esto podría ayudar a confirmar que el hierro disminuye la actividad de la enzima ALA-D.

Los pacientes tratados sólo con dieta, son los que muestran mayor descenso en la actividad de la enzima ALA-D al aumentar la ferritinemia, con una relación inversa entre ambos parámetros ($r = -0,66$). Igualmente, en este grupo al incrementarse la ferritinemia, aumenta la actividad de la enzima PBG-D ($r = 0,53$), probablemente como un intento para compensar la hipoactividad de la enzima ALA-D. Parece por tanto que la terapia con insulina o sulfonilurea podrían atenuar, de forma parcial, los efectos del hierro sobre la ruta del hemo.

En los enfermos de DMID no fue posible valorar las cifras de hierro ni ferritina séricos.

VALORES DE ZINC SERICO EN LA DMNID Y SU POSIBLE INFLUENCIA EN LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL HEMO.-

El zinc contenido en la dieta se absorbe en el duodeno y pasa al plasma uniéndose a varias sustancias: albúmina (85-90%), alfa2 macroglobulina y aminoácidos. Se distribuye por el organismo alcanzando sus mayores concentraciones en próstata, riñón, hígado y músculo estriado (197). Se excreta fundamentalmente en las heces y sólo una pequeña cantidad en la orina (197).

La mayoría de los estudios realizados en enfermos con DM sobre el metabolismo del zinc, muestran una hiperzinuria (198, 199, 200, 201). Hägglof y al. (198) observaron un descenso del zinc sérico en el momento del diagnóstico de DMID, con un gradual incremento hacia la normalidad en el primer mes de terapia insulínica.

Melchior y col (202) en un estudio realizado a lo largo de dos años no encontraron diferencias en los valores de zinc plasmático entre los pacientes con diagnóstico reciente de DMID y controles sanos. Sin embargo, tanto las mujeres diabéticas, comparadas con los varones diabéticos, como las mujeres sanas, comparadas con los varones controles, presentaron un valor de zinc plasmático menor; esta diferencia desaparecía al considerar la edad y la albúmina sérica.

En el presente trabajo sólo fue posible determinar zinc sérico en 85 de los 99 enfermos con DMNID: no se pudo valorar el zinc sérico en los pacientes con DMID. Las cifras de zincemia de nuestros pacientes (75

$\mu\text{g/dl}$) tendían al límite inferior de los valores de referencia del laboratorio (70-120 $\mu\text{g/dl}$).

De los tres grupos terapéuticos de DMNID, los tratados con dieta presentaron mayores cifras de zincemia que los pacientes que necesitaron terapia con sulfonilurea o insulina (**Tabla XIX, pag 87**).

El valor de zinc sérico del grupo insulínico tiende a ser menor que el del grupo tratado con sulfonilurea. Esta tendencia es más evidente si excluimos, de los 44 pacientes tratados con insulina, a 13 que recibían terapia con insulina con zinc. Los 31 enfermos restantes, tratados con insulina sin zinc, presentaron un valor medio de zinc sérico por debajo de los límites normales del laboratorio (**Fig 40**).

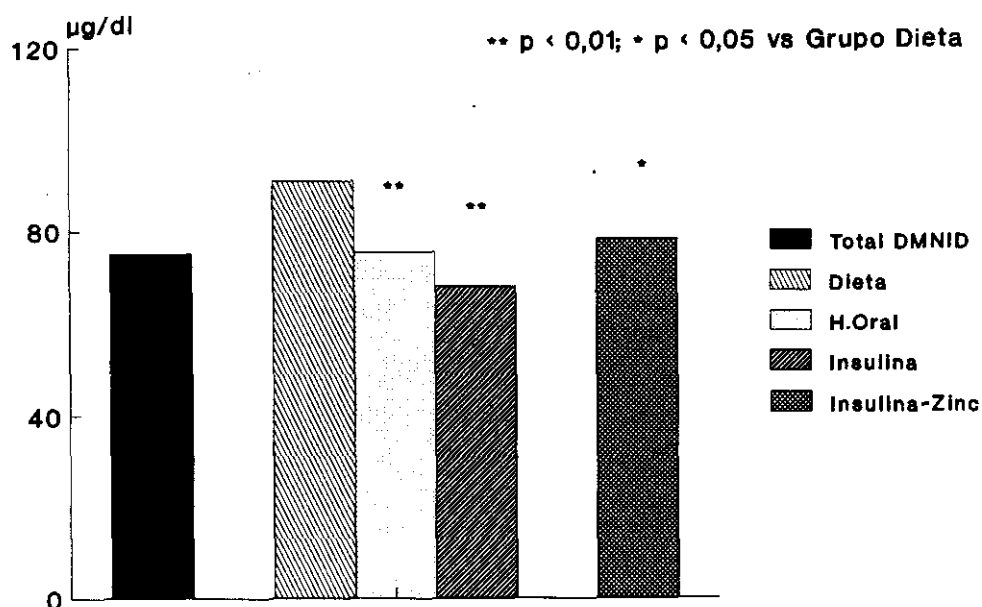


Figura 40: Zincemia en el total de enfermos con DMNID en los diferentes Grupos Terapéuticos

Se desprende de lo expuesto que en nuestros pacientes con DMNID los niveles de zinc sérico tienden a ser bajos, tanto más cuanto mayor es la gravedad de la diabetes, por tanto cuanto más profunda sea la disfunción de las células beta pancreáticas.

Cuando la deficiencia de zinc es leve, el nivel de zincemia suele permanecer normal (203). Según Meftah y cols (204), en las deficiencias de este elemento, primero desciende la actividad de la enzima linfocitaria 5'nucleotidasa, que es zinc-dependiente, después el zinc de linfocitos, granulocitos y plaquetas y finalmente el zinc plasmático.

Puesto que las deficiencias ligeras de zinc suelen cursar con zincemias normales y los enfermos diabéticos de nuestro trabajo presentan unos valores en el límite bajo de normalidad, podría concluirse que sufren una deficiencia ligera de este elemento.

El zinc es un cofactor imprescindible para el correcto funcionamiento de la enzima ALA-D (205, 206), ya que protege sus grupos sulfhidrilos que son imprescindibles para su actividad enzimática. Ya hemos indicado anteriormente que nuestros enfermos con DM presentan un descenso en la actividad de la enzima ALA-D; tal vez contribuya a este descenso la ligera deficiencia de zinc que parecen sufrir estos pacientes.

Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (66) puso de manifiesto la importancia de la deficiencia de zinc para la actividad de la enzima ALA-D; en dicho estudio se administró zinc, por vía oral, a ocho enfermos con insuficiencia renal terminal que presentaban una zincemia inferior a la del grupo control y se comprobó que durante la administración de este elemento la actividad de la enzima ALA-D se incrementaba, para volver a descender cuando se interrumpía la administración del mismo.

Sin embargo, en nuestros pacientes con DMNID las modificaciones de la zincemia no parecieron influir sobre la actividad ni sobre la cantidad estimada de la enzima ALA-D. Tampoco se modifica la actividad de la enzima PBG-D (Fig 41).

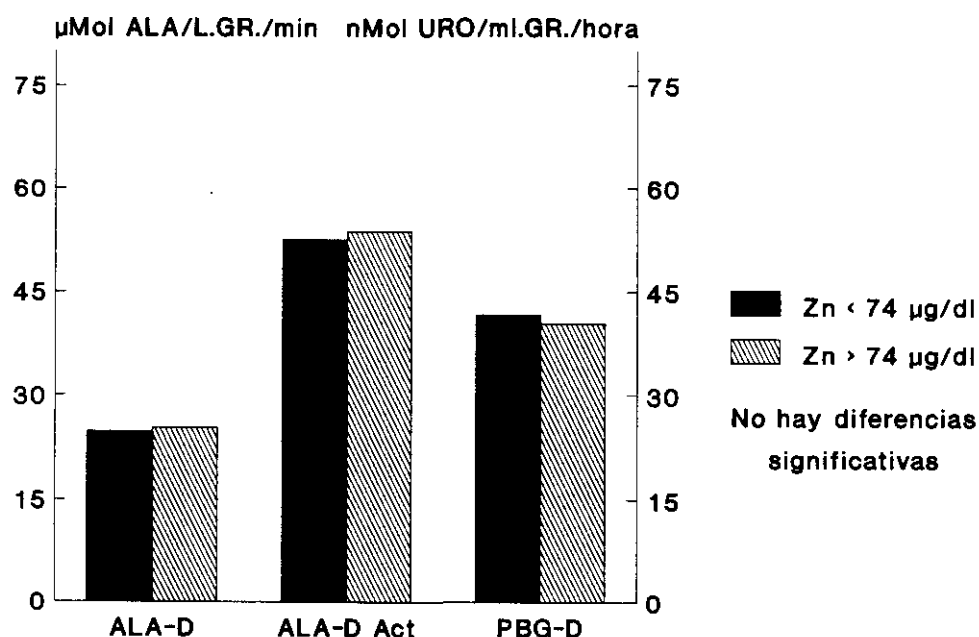


Figura 41: Enzimas de la ruta del hemo en pacientes de DMNID clasificados por el P50 del ZINC sérico

Las 50 mujeres con DMNID incluidas en este estudio muestran un zinc sérico ($73,4 \pm 14 \mu\text{g/dl}$) que tiende a ser ligeramente menor que el observado en los 35 varones ($79 \pm 19 \mu\text{g/dl}$), lo que concuerda con los datos de Melchior y col (202). En efecto, estos autores estudiaron enfermos con DMID de reciente diagnóstico durante dos años y encontraron que las mujeres presentaban una zincemia inferior a la de los varones a lo largo de todo el estudio, pero similar a la presentada por las mujeres que integraban el grupo control.

ALTERACIONES DE LAS PORFIRINAS PLASMATICAS, URINARIAS Y ERITROCITARIAS EN DM.-

Las porfirinas sintetizadas en el organismo son tanto más hidrosolubles cuando mayor es el número de grupos carboxílicos libres en sus cadenas laterales. Así encontramos que la porfirina octocarboxílica (UROporfirina) es la más hidrosoluble, la dicarboxílica (PROTOporfirina) la menos hidrosoluble y la tetracarboxílica (COPROporfirina) presenta un grado medio.

En el plasma, las porfirinas circulan en un 85% unidas a proteínas plasmáticas (albúmina, hemopexina, alfa2 globulinas) (207, 208). La afinidad de las porfirinas por las proteínas plasmáticas es inversamente proporcional a su hidrosolubilidad, por ello la protoporfirina, al ser la más hidrofóbica, se unirá a las proteínas plasmáticas con mayor intensidad.

Las porfirinas pueden ser eliminadas del organismo por dos vías: renal y biliofecal. La vía renal sirve para eliminar las porfirinas hidrosolubles, por tanto uroporfirina, mientras que la vía biliofecal se utiliza para excretar las porfirinas hidrofóbicas, por tanto protoporfirina. La coproporfirina puede ser excretada por ambas vías, ya que presenta una hidrosolubilidad intermedia. Sin embargo, la coproporfirina predomina sobre la uropofirina en la orina de la población general; la proporción de coproporfirina sobre uroporfirina es de 7/1 (209).

Como parte de un trabajo realizado en nuestro laboratorio (210), se estudió la concentración de porfirinas urinarias en 33 enfermos de DMNID y no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control.

En el presente estudio, los pacientes de DMID presentan una concentración de porfirinas plasmáticas y urinarias que tiende a ser mayor que la de su grupo control (**Fig 42**) y en los enfermos de DMNID ambas concentraciones superan netamente a las de su grupo control (**Fig 43**). La concentración de porfirinas en hematíes es similar en ambos grupos de diabéticos y no difieren de sus respectivos controles.

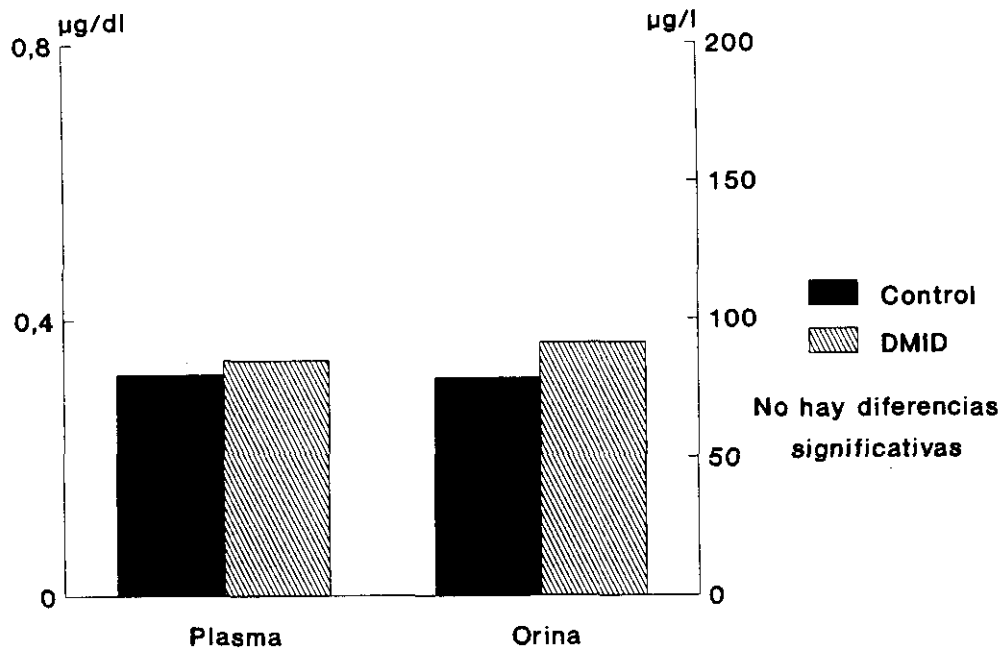


Figura 42: Concentración de porfirinas Plasmáticas y Urinarias en enfermos con DMID

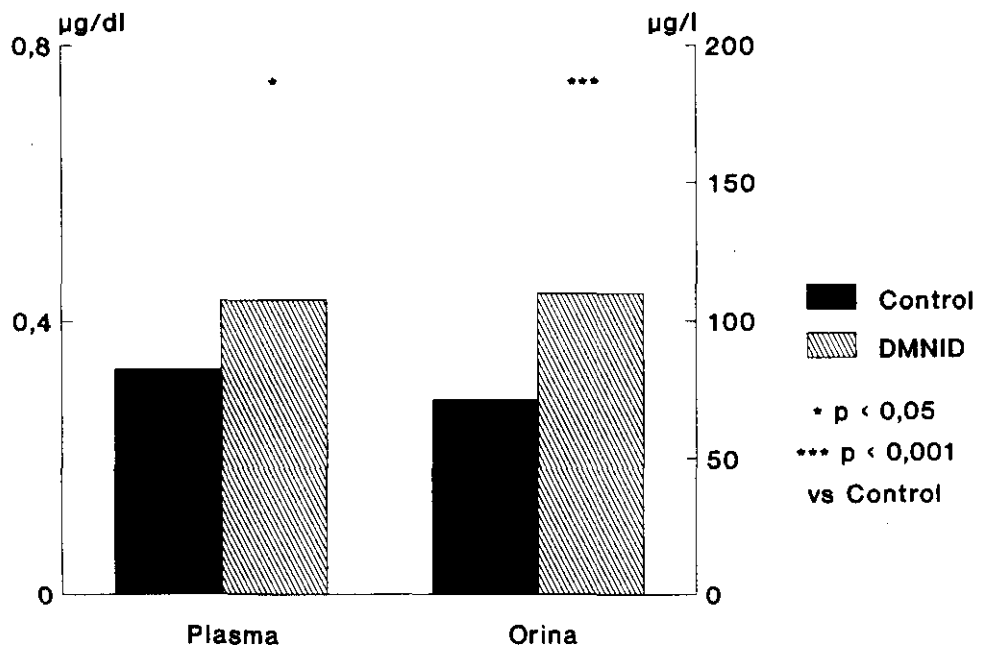


Figura 43: Concentración de porfirinas Plasmáticas y Urinarias en enfermos con DMNID

En ambos tipos de DM, la porfirina que predomina en orina es la coproporfirina ya que la fluorescencia máxima se obtiene a una longitud de onda próxima a 404 nm, que es la longitud de onda de la coproporfirina pura (404,0-403,8). En las porfirinopatías secundarias a otra enfermedad lo habitual es que aumente la coproporfirina en orina, mientras que en las porfirias suele aumentar la uroporfirina urinaria (211).

Sin embargo, como ya comentábamos en la introducción, la excreción patológica de porfirinas urinarias se ha descrito en muchas enfermedades, además de las porfirias. Así, en las situaciones colestásicas se observa un incremento de la excreción de coproporfirina urinaria, junto a un descenso de su eliminación fecal; la colestasis puede ser tanto congénita: Síndrome de Dubin-Johnson, Rotor y Gilbert (68), como adquirida (67). También en hepatopatías crónicas se observa una coproporfirinuria que parece depender más del grado de colestasis que del tipo histológico de la hepatopatía o el grado de afectación funcional hepática (69).

Igualmente, se ha descrito una elevación de coproporfirina urinaria en algunas anemias; los pacientes homocigotos de betatalasemia presentan aumento de la coproporfirina urinaria (212), al igual que los enfermos con anemia falciforme (213) y los que padecen una leucemia aguda o crónica (213). También se ha descrito elevación de la coproporfirina urinaria en enfermos con poliomielitis aguda y con infecciones purulentas (214).

Parece por tanto, que la elevación de la cantidad de porfirinas en orina es bastante inespecífica, ya que se produce en muchas enfermedades.

Si clasificamos a los enfermos con DMNID en grupos terapéuticos, observamos que la concentración de porfirinas plasmáticas tiende a ser mayor en el grupo tratado con insulina que en los otros dos grupos terapéuticos y el grupo control (**Fig 44**).

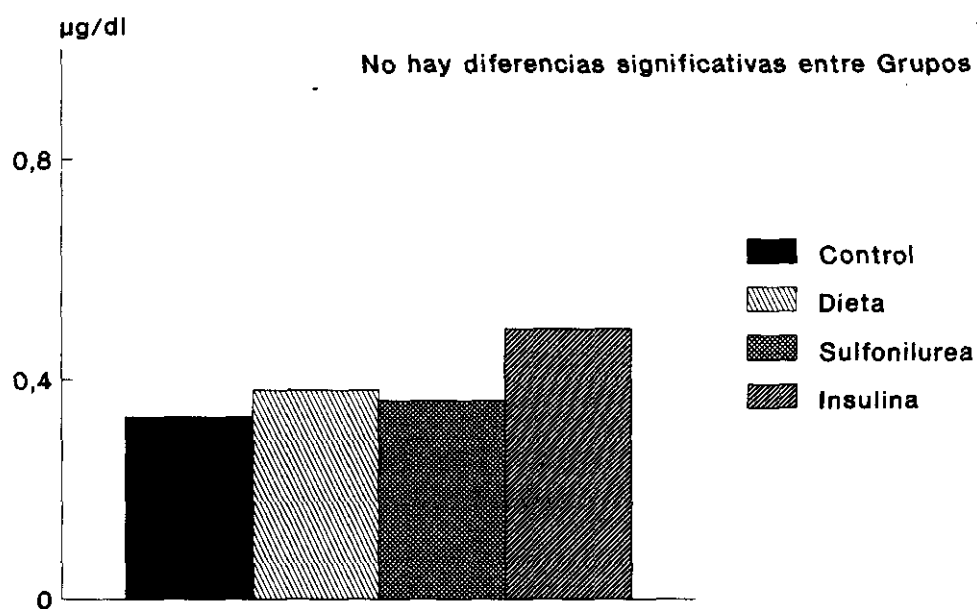


Figura 44: Porfirinas Plasmáticas en los 3 Grupos Terapéuticos de DMNID y el Grupo Control

Igualmente, la concentración de porfirinas urinarias en los grupos tratados con insulina y con sulfonilurea es mayor que la del grupo control. De los grupos terapéuticos, el grupo insulínico tiende a presentar mayor concentración porfirínica que el grupo tratado con sulfonilurea (Fig 45).

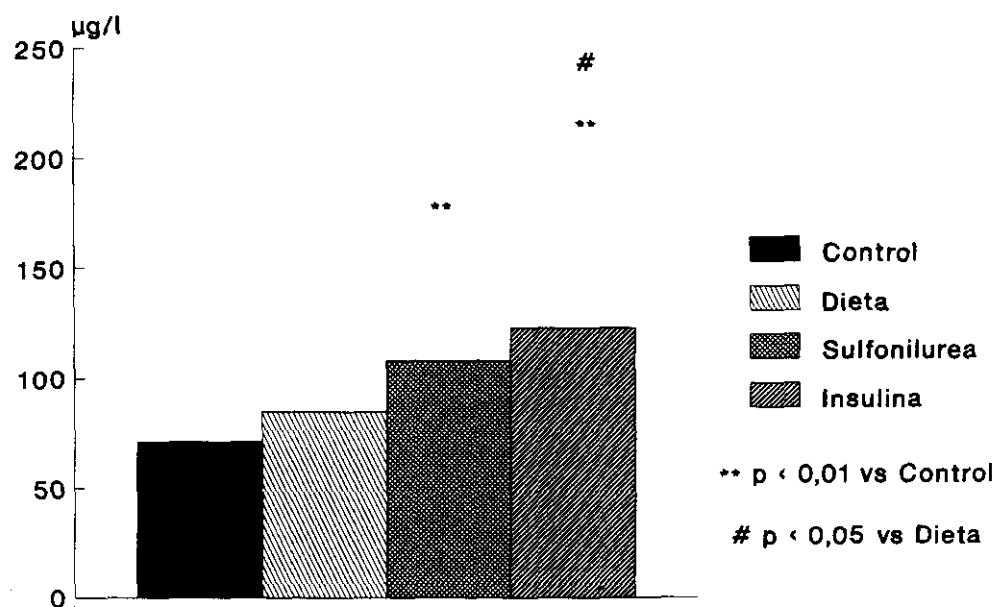


Figura 45: Porfirinas Urinarias en los 3 Grupos Terapéuticos de DMNID y el Grupo Control

Por tanto, el grupo tratado con insulina es el que tiende a presentar mayor concentración de porfirinas tanto plasmáticas como urinarias; es también este grupo, el que presumiblemente presenta mayor trastorno fisiopatológico de DM, con mayor deterioro de la función beta pancreática.

INFLUENCIA DE LA EDAD, TIEMPO DE EVOLUCION, SUPERFICIE CORPORAL Y SEXO EN LA CONCENTRACION DE PORFIRINAS PLASMATICAS, URINARIAS Y ERITROCITARIAS EN DM.-

En la bibliografía a nuestro alcance, sólo se hace referencia a las posibles modificaciones en la excreción de porfirinas urinarias en función de la edad o el sexo, en individuos sanos. Hsia y Page en 1954 (215) estudiaron la excreción de porfirinas en orina de 24 horas en jóvenes sanos con edad comprendida entre 6 y 16 años y demostraron que estaba relacionada con el peso corporal, edad y superficie corporal.

En un trabajo realizado en nuestro laboratorio (210) se encontró que la población general con edad inferior a 15 años mostraban menor excreción de porfirinas en orina que el resto del colectivo analizado.

Bloom y cols en 1991 (214) mostraron que la excreción de porfirinas urinarias en niños sanos con edad inferior a 9 años era menor que en personas de edad comprendida entre 9 y 18 años y adultos. Pero sólo pudieron establecer una correlación entre la excreción urinaria de porfirinas, la edad y el peso corporal, cuando esta excreción se expresaba en relación a la concentración de creatinina urinaria y sólo hasta los 9 años de edad y 30 Kg de peso.

En nuestros enfermos de DMID, de edades comprendidas entre 3 y 34 años, la concentración de porfirinas plasmáticas (**Fig 46**) aumenta de forma paralela al tiempo de evolución de la diabetes ($r = 0,42$) mientras que la concentración de porfirinas urinarias (**Fig 47**) se incrementa de forma paralela a la edad ($r = 0,49$). La edad y el tiempo de evolución de la enfermedad están relacionados ($r = 0,61$).

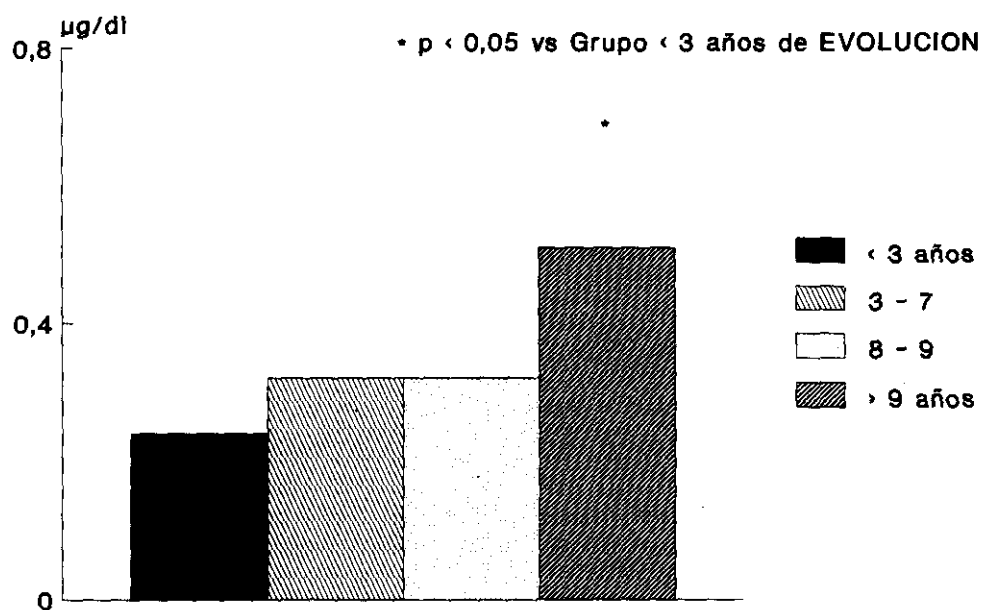


Figura 46: Porfirinas Plasmáticas en enfermos con DMID, clasificados por los cuartiles del tiempo de EVOLUCION

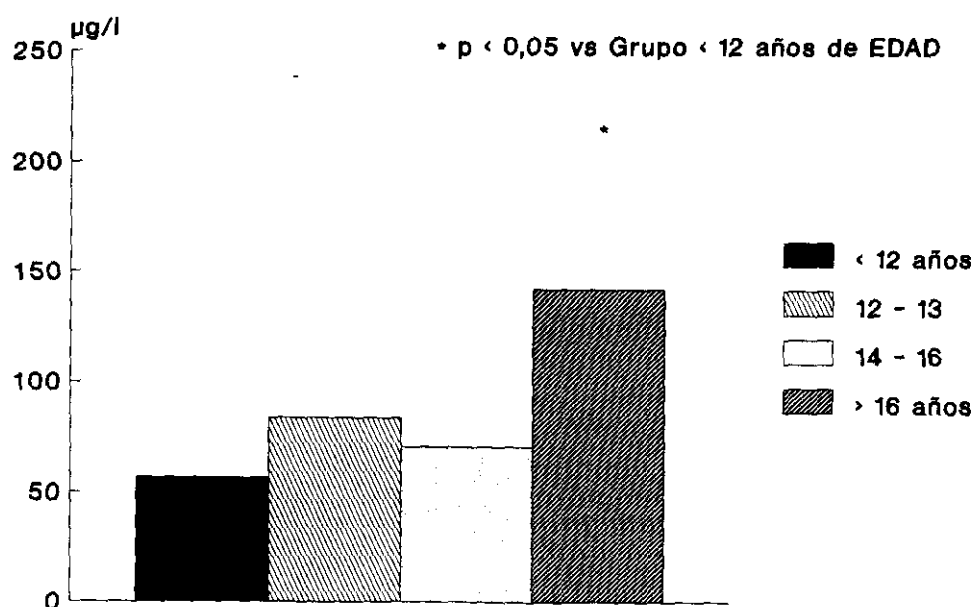


Figura 47: Porfirinas Urinarias en enfermos con DMID, clasificados por los cuartiles de la EDAD

De forma similar a la DMID, nuestros enfermos de DMNID presentan mayor concentración de porfirinas plasmáticas al aumentar el tiempo de evolución (Fig 48). La concentración de porfirinas urinarias (Fig 49) aumenta de manera paralela a la edad ($r = 0,24$), hasta alcanzar 69 años (percentil 75), momento en el que comienza a disminuir. Igualmente, en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (210) se describe que la excreción de porfirinas urinarias disminuye a partir de los 45 años de edad en la población general, aunque la edad máxima del estudio fue 65 años.

En DMNID también observamos una débil relación positiva entre la edad y el tiempo de evolución ($r = 0,26$).

De los datos mostrados parece desprenderse que en los dos tipos de enfermos diabéticos, la concentración de porfirinas plasmáticas aumenta con el tiempo de evolución mientras que la concentración de porfirinas urinarias se incrementa con la edad hasta alcanzar 69 años, momento en el que comienza a disminuir.

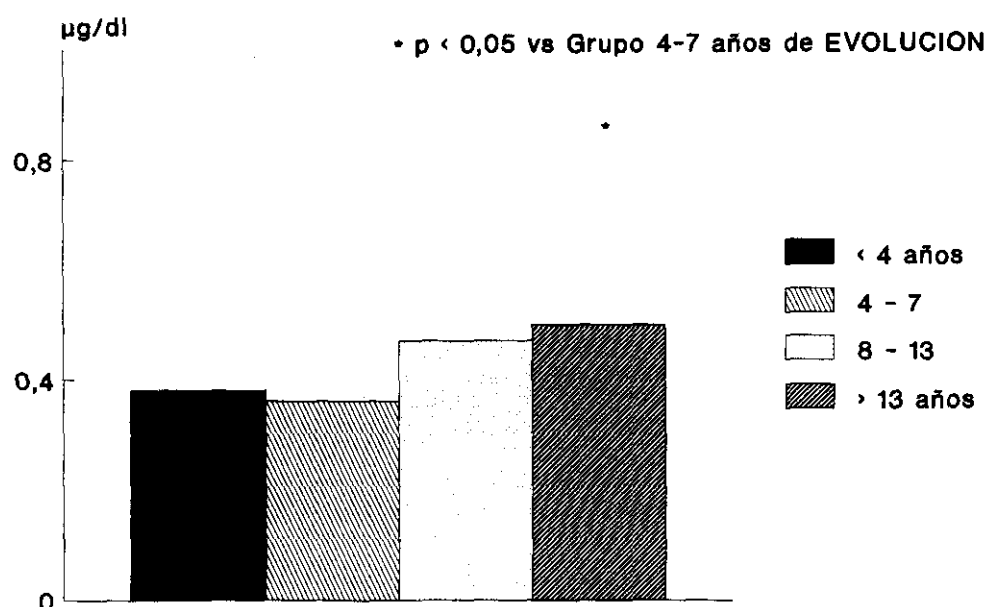


Figura 48: Porfirinas Plasmáticas en enfermos con DMNID clasificados por los cuartiles del tiempo de EVOLUCION

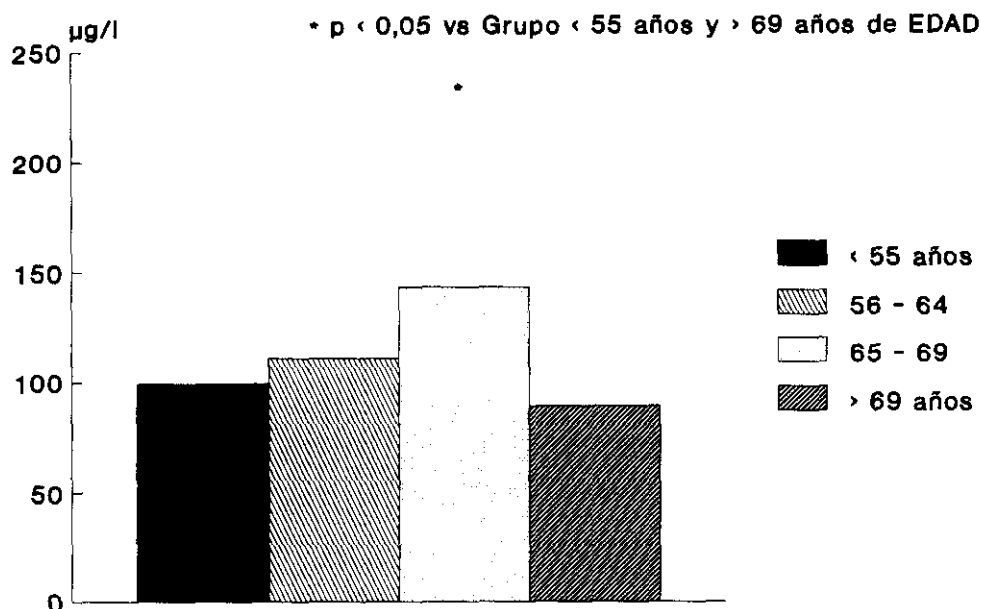


Figura 49: Porfirinas Urinarias en enfermos con DMNID, clasificados por los cuartiles de la EDAD

Si clasificamos a los enfermos con DMNID en los tres grupos terapéuticos, apreciamos que la edad es similar en los tres, sin embargo el tiempo de evolución es mayor en los pacientes tratados con insulina y con sulfonilurea que en los tratados con dieta (**Tabla XXI, pag 89**).

La concentración de porfirinas plasmáticas tiende a aumentar cuando se incrementa el tiempo de evolución únicamente en los grupos tratados con sulfonilurea o insulina; la tendencia es más marcada en el grupo insulínico que es de los dos el que presenta más años de evolución. Sin embargo, en el grupo tratado con dieta no se modifica la concentración de porfirinas plasmáticas con este parámetro; tal vez se deba a que este grupo presenta menor tiempo de evolución o a que sufre un trastorno fisiopatológico más leve (**Fig 50**).

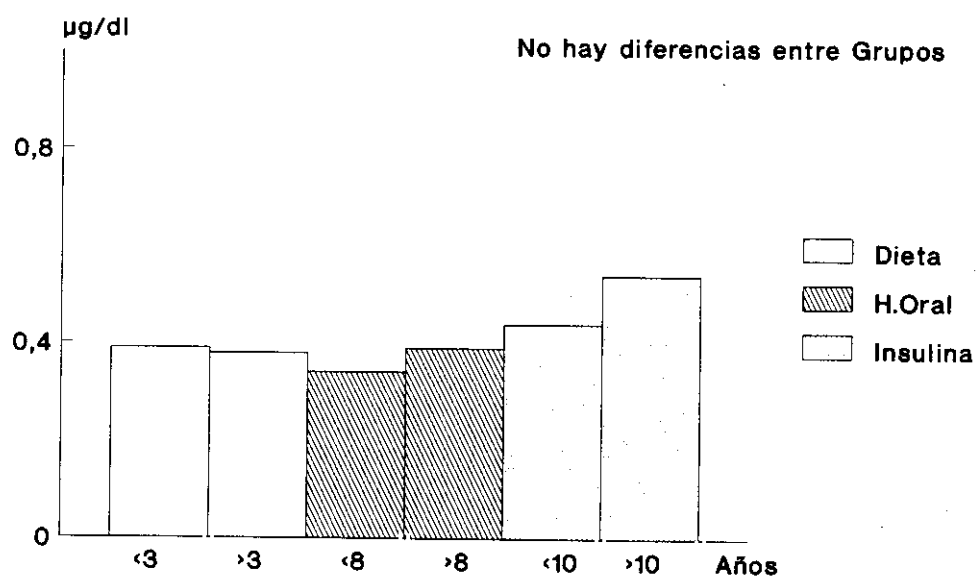


Figura 50: Porphirinas plasmáticas en los 3 Grupos Terapéuticos de DMNID clasificados por el P50 del tiempo de EVOLUCION

La concentración de porfirinas urinarias tiende a aumentar con la edad en los tres grupos terapéuticos, aunque la tendencia es más fuerte en el grupo tratado con insulina (**Fig 51**).

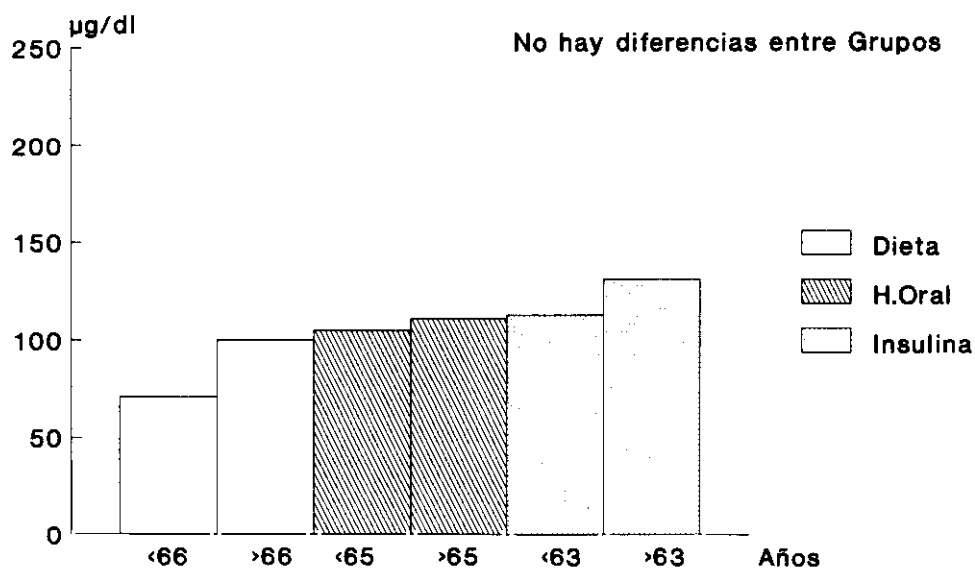


Figura 51: Porphirinas Urinarias en los 3 Grupos Terapéuticos de DMNID clasificados por P50 de EDAD

Enriquez de Salamanca y Cols en 1982 (216) mostraron que los varones sanos con edades comprendidas entre 21 y 40 años, tenían una coproporfirinuria superior a las mujeres. Bloom y cols en 1991 (214) encontraron que el sexo no influía en la excreción de porfirinas urinarias en niños sanos, hasta los 9 años de edad; sin embargo, los varones adultos excretaban mayor cantidad de porfirinas en orina que las mujeres.

En nuestro trabajo, tanto en DMID (**Tabla XV, pag 84**) como en DMNID (**Tabla XXXVIII, pag 105**), la concentración de porfirinas en plasma, orina y hematíes es similar en ambos sexos.

INFLUENCIA DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO EN LA CONCENTRACION DE PORFIRINAS PLASMATICAS, URINARIAS Y ERITROCITARIAS EN DM.-

La concentración de porfirinas plasmáticas no se modifica con el valor de glucemia en los dos tipos de DM, sin embargo al aumentar el porcentaje de HBA1 parece que tiende a incrementarse la concentración de porfirinas plasmáticas (**Fig 52**).

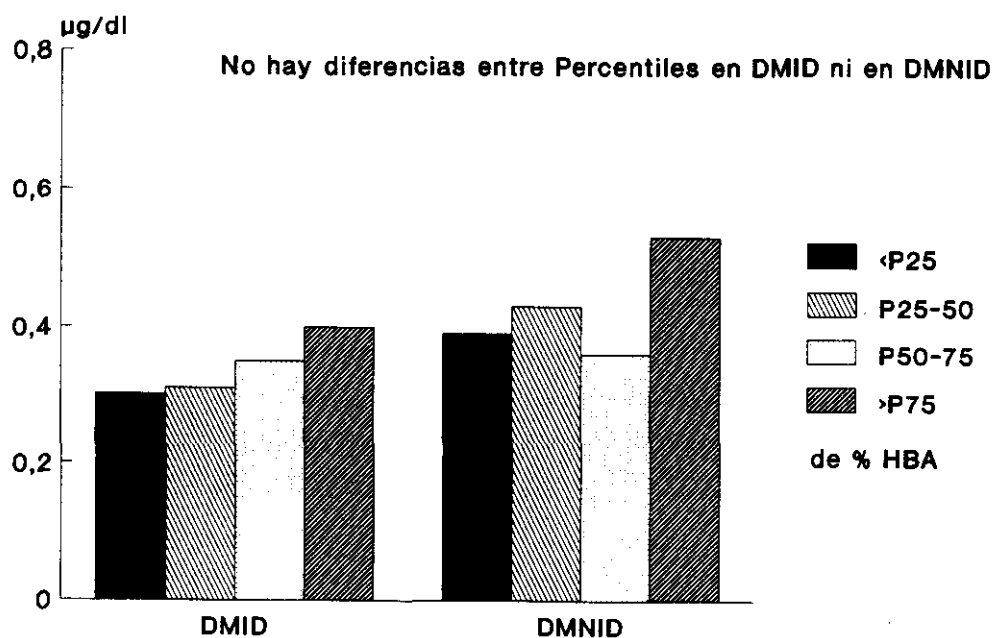


Figura 52: Porfirinas Plasmáticas en enfermos con DMID y DMNID clasificados por los percentiles del Porcentaje de HBA1

En el apartado anterior de este trabajo se ha descrito tanto en DMID como en DMNID que cuanto mayor es el tiempo de evolución mayor es la concentración de porfirinas plasmáticas. Al aumentar el porcentaje de HbA1 también se incrementa el tiempo de evolución en DMID, mientras que tiende a elevarse en DMNID; por tanto es posible que la tendencia de las porfirinas plasmáticas a aumentar con el porcentaje de HbA1, esté en parte relacionada con el incremento del tiempo de evolución que acompaña al porcentaje de HbA1 (Fig 53).

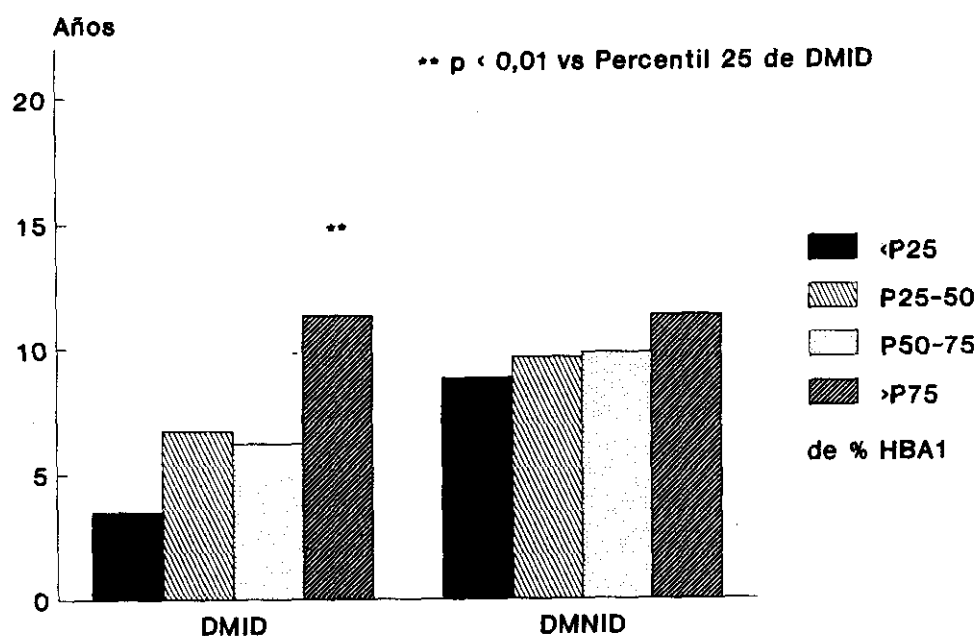


Figura 53: Años de evolución en enfermos con DMID y DMNID clasificados por los percentiles del Porcentaje de HbA1

La concentración de porfirinas urinarias y en hematíes no se modifican ni con el valor de la glucemia, ni con el porcentaje de HbA1, tanto en DMID como en DMNID.

INFLUENCIA DEL ZINC, HIERRO Y FERRITINA SERICOS EN LA CONCENTRACION DE PORFIRINAS PLASMATICAS, URINARIAS Y ERITROCITARIAS EN DMNID.-

La concentración de porfirinas plasmáticas en pacientes con DMNID no presenta modificaciones al variar el zinc, el hierro o la ferritina séricos.

La concentración de porfirinas urinarias desciende al aumentar el zinc sérico (**Fig 54**), se eleva al aumentar la sideremia (**Fig 54**) y no se modifica con el valor de la ferritina sérica. De todas formas, ya hemos comentado que la alteración en la cantidad excretada de porfirinas urinarias es un hallazgo muy inespecífico.

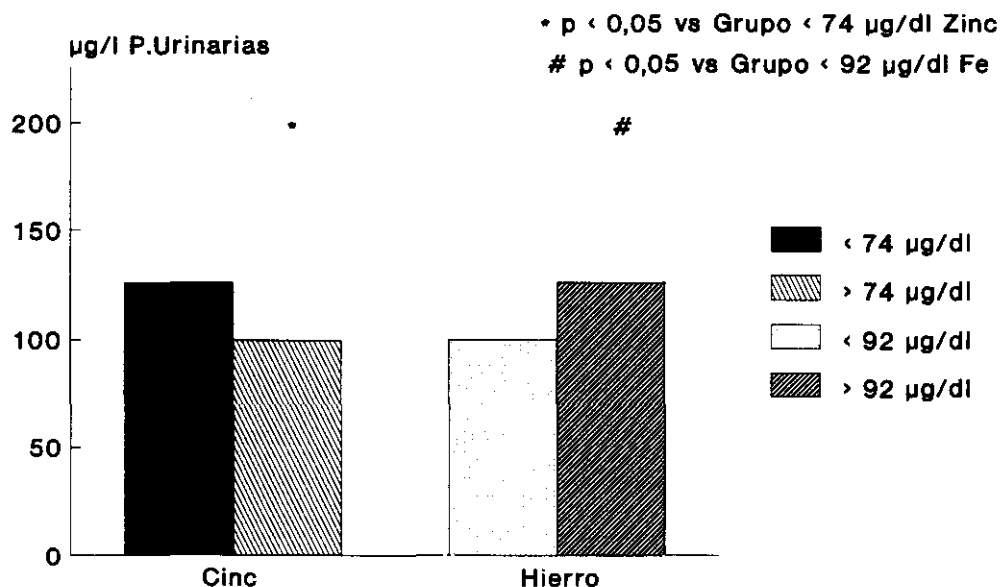


Figura 54: Porfirinas Urinarias en enfermos con DMNID, clasificados el P50 de ZINC sérico y SIDEREMIA

El hierro, en forma de ion ferroso, interviene como substrato en el último paso de la síntesis del hemo; la enzima ferroquelatasa lo inserta en la molécula de protoporfirina IX y se forma el grupo prostético hemo. En la anemia ferropénica aumenta la concentración de protoporfirina eritrocitaria, ya que al no existir suficiente cantidad de hierro, no se puede convertir la protoporfirina IX en hemo (58). En nuestra casuística la concentración de porfirinas en hematíes tiende a descender ligeramente al aumentar la sideremia y desciende con el incremento de la ferritina sérica (**Fig 55**). Pero ya se ha comentado anteriormente que uno de los criterios de exclusión de este trabajo fue la presencia de anemia.

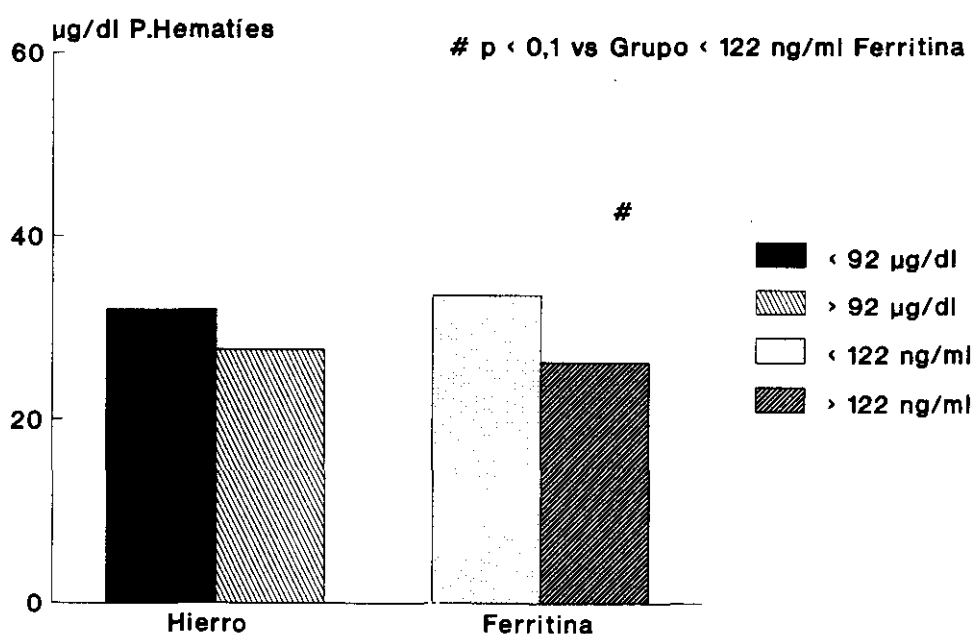


Figura 55: Porphirinas en Hematíes, pacientes de DMNID, clasificados por el P50 de SIDEREMIA y FERRITINEMIA

DISCUSSION

Los pacientes diabéticos, tanto con DMID como con DMNID, presentan alterada la ruta biosintética del hemo en eritrocitos. La actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria está descendida de forma similar en ambos tipos de diabetes y esta hipoactividad no se recupera cuando se añade "in vitro" zinc y tiones, lo que indica que la concentración enzimática está disminuida y, por tanto, o está descendida su síntesis o aumentada su destrucción. Las alteraciones en la ruta biosintética del hemo encontradas en pacientes diabéticos se confirman en DM experimental, donde está descendida la actividad y la concentración de la enzima ALA-D tanto en eritrocitos como en tejido hepático. No se pudo determinar la actividad de la enzima ALA-S en los eritrocitos, tanto en DM humana como experimental, por tratarse de una enzima mitocondrial y carecer estas células de mitocondrias.

Habitualmente la actividad de las enzimas ALA-D y ALA-S suelen presentar una relación inversa; así en tejido hepático cuando por cualquier motivo [sobrecarga de hierro (193), intoxicación por plomo (213), sobrecarga de etanol (213)] desciende la actividad de la enzima ALA-D, se suele originar un incremento paralelo en la actividad de la enzima ALA-S. En médula ósea los estudios son menos frecuentes, pero en la anemia ferropénica se ha descrito en los eritrocitos un incremento de la actividad enzimática de ALA-D y en los eritroblastos un descenso paralelo de la actividad de la enzima ALA-S (217, 218)

Nosotros al encontrar inhibida la actividad y descendida la concentración de la enzima ALA-D eritrocitaria, podemos suponer que la actividad de la enzima ALA-S en médula ósea se encuentra incrementada y por tanto la ruta biosintética del hemo en médula ósea ya que la actividad de la enzima ALA-S es limitante en esta ruta metabólica junto a la cantidad de hemo celular y del hierro citoplásmico, (12, 13, 14, 50). No hemos encontrado en la bibliografía a nuestro alcance trabajos en DM, tanto

humana como experimental, que estudien la actividad de la enzima ALA-S en médula ósea.

Por otro lado si hemos encontrado estudios sobre la actividad de la enzima ALA-S en DM experimental y en tejido hepático, aunque los resultados son contradictorios; Cánepa y cols (165, 166) describen aumento de la actividad de la enzima ALA-S en tejido hepático, pero Bitar y Weiner (157) encuentran en este tejido descendida la actividad tanto de la enzima ALA-S como ALA-D. Los estudios realizados en los tres últimos años describen la presencia de dos isoenzimas ALA-S (12, 13, 14, 50): ALA-S común o no eritroide que se encuentra en todos los tejidos, pero sobre todo en tejido hepático y ALA-S eritroide que sólo se localiza en médula ósea; no se ha demostrado que la actividad de una y otra isoenzimas sea paralela.

Otras causas capaces de producir hipoactividad de la enzima ALA-D eritrocitaria, como las intoxicaciones por metales pesados [plomo (71, 72), sales de oro (74), mercurio (179) o cadmio (213)], o el aumento de la ingesta de etanol (75, 76, 77, 78), sólo inhiben su actividad que se recupera "in vitro" al añadir zinc, tioles o agentes reductores, sin que esté alterada la concentración enzimática. Sin embargo, en la DM la enzima ALA-D eritrocitaria está inhibida y además reducida su concentración, lo que parece indicar una mayor afectación de la ruta metabólica.

Tanto los enfermos con DMID como con DMNID presentan un descenso similar de la actividad y de la concentración de la enzima ALA-D eritrocitaria. También los enfermos de los tres grupos terapéuticos de DMNID muestran parecida hipoactividad y disminución de la concentración de esta enzima. Estos datos indican que la alteración de la ruta biosintética del hemo es independiente de la gravedad del trastorno fisiopatológico que causa la DM.

Sin embargo, en los dos tipos de DM, el control del metabolismo hidrocarbonado influye en la alteración de la ruta del hemo; el descenso de la actividad y de la concentración de enzima ALA-D eritrocitaria es tanto mayor cuanto más aumenta la glucemia, si bien en la DMID influye más la glucemia media (porcentaje de HbA1) y en la DMNID el valor concreto.

De lo expuesto se deduce que en la DM la alteración de la síntesis del hemo no está relacionada con la gravedad del trastorno fisiopatológico que causa la enfermedad, pero si se relaciona con el control del metabolismo hidrocarbonado de la misma. Esto se confirma en nuestro modelo de DM experimental. En las ratas diabéticas también está disminuida la actividad y la concentración de la enzima ALA-D tanto en eritrocitos como en tejido hepático y en los eritrocitos cuanto mayor es la glucemia mayor es el descenso de la actividad y concentración de la enzima ALA-D. En el tejido hepático existe una relación inversa entre glucemia, actividad y concentración de la enzima ALA-D.

Estos resultados coinciden con los de Batlle y cols (172) que describen en pacientes diabéticos una relación negativa entre la actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria y los valores glucémicos, así como con los de Rossetti y cols (168) que muestran esta relación inversa en DM experimental.

Se ha observado tanto en la DM humana (187) como en la experimental (188) un descenso de la concentración de glutatión, especialmente en su forma reducida que desaparece en la DM experimental al normalizar la glucemia. El glutatión protege los grupos sulfhidrilos y evita el daño oxidativo celular. Por ello, la administración de glutatión a pacientes diabéticos disminuye la viscosidad de la membrana celular y aumenta su elasticidad (219). Los grupos sulfhidrilos son importantes para la actividad de la enzima ALA-D y por tanto su disminución, al rebajarse la forma

reducida de glutatión, justificaría el descenso de la actividad enzimática de ALA-D en pacientes diabéticos, pero no explica el descenso de su concentración, como ponen de manifiesto Djordjevic y col (220); estos autores describen un descenso de la actividad enzimática de ALA-D eritrocitaria en pacientes con nefropatía de los balcanes, sin embargo la actividad enzimática se recupera totalmente cuando se añade "in vitro" GSH y zinc.

La glicosilación no enzimática de las proteínas que se produce en la DM, podría contribuir a explicar el descenso de la actividad y de la concentración de la enzima ALA-D, ya que la glicosilación podría modificar su función, su estructura y su estabilidad y por tanto producir su inactivación tal como propone Djordjevic (221). En nuestro trabajo, la relación encontrada entre el control del metabolismo hidrocarbonado y las alteraciones de la ruta hemo en DM, sería favorable a esta proposición, aunque sólo se realizó una valoración aislada del metabolismo hidrocarbonado y de la enzima ALA-D. Las determinaciones seriadas y paralelas de glucemia, porcentaje de HbA1, actividad y concentración de la enzima ALA-D eritrocitaria ayudarían a confirmar o negar esta teoría. Igualmente ayudaría a confirmar la importancia de la glucemia como agente causal de las alteraciones de la ruta del hemo, el estudio de esta ruta en pacientes diabéticos en situaciones extremas: coma cetoacidótico o hiperosmolar.

En ambos tipos de DM, la actividad de la enzima PBG-D eritrocitaria, que cataliza el siguiente paso de la ruta del hemo, se encuentra aumentada y es probable que intente compensar la hipoactividad de la enzima ALA-D. Sin embargo, en el modelo de DM experimental la actividad de la enzima PBG-D, aunque aumenta en tejido hepático, sólo tiende a incrementarse en eritrocitos.

En nuestro trabajo, no influyeron en las alteraciones de la ruta del hemo ni la edad, ni el tiempo de evolución, ni la superficie corporal. Sin embargo, las mujeres con DMNID presentan, con independencia del control del metabolismo hidrocarbonado, mayor actividad de las enzimas ALA-D y PBG-D aunque la concentración de la enzima ALA-D es similar en ambos sexos. En nuestro grupo control no encontramos entre ambos sexos diferencias en la actividad de las enzimas ALA-D y PBG-D.

Hemos observado en nuestros pacientes con DMNID que la sideremia y la ferritina sérica influyen en la ruta eritrocitaria de la biosíntesis del hemo; aunque fueron excluidos los pacientes con uno o ambos parámetros alterados, cuanto mayor es la sideremia o ferritinemia, menor es la actividad y la concentración de la enzima ALA-D. No hemos encontrado referencias en relación con ello en personas sanas con sideremia y ferritinemia dentro de la normalidad.

El hierro ejerce un papel importante en el control de la biosíntesis del hemo especialmente en el tejido eritroide, donde los niveles de hierro en el citoplasma de las células eritroides y la enzima ALA-S eritroide regulan esta vía metabólica (14, 50). En pacientes con anemia ferropénica se ha descrito hiperactividad de la enzima ALA-D eritrocitaria (222, 223), alteración que desaparecía al tratar a los pacientes con suplementos de hierro (224).

En animales de experimentación no diabéticos se ha observado que una sobrecarga aguda de hierro produce un descenso temporal en la actividad de la enzima ALA-D hepática, con elevación especular de la actividad enzimática de ALA-S, junto a una depleción de GSH que contribuiría a la hipoactividad de la enzima ALA-D (193). A su vez la sobrecarga crónica de hierro origina un descenso de la actividad de la enzima ALA-D hepática paralela al aumento de la concentración de hierro hepático, que revierte cuando cesa la administración de hierro (194).

Se podría pensar que fuera el hierro por si mismo el que modificara la ruta del hemo en nuestros pacientes con DMNID, aunque su sideremia y su ferritinemia estaban dentro de los límites establecidos por el laboratorio. Tal vez, en la DM la ruta del hemo al estar alterada, se muestra más sensible a las modificaciones de los niveles de hierro.

El zinc es un cofactor imprescindible para el buen funcionamiento de la enzima ALA-D (205, 206), debido a que protege sus grupos sulfhidrilos que son fundamentales para la actividad enzimática. Nosotros determinamos la zincemia a 85 pacientes con DMNID y aunque tendían al límite inferior de los valores de referencia del laboratorio, los valores de zinc sérico no se relacionaron con las enzimas estudiadas de la ruta del hemo.

La deficiencia leve de zinc puede cursar con valores de zincemia normales (203); Meftah y cols (204) observan que en las deficiencias ligeras de zinc primero descende la actividad de la enzima linfocitaria 5'nucleotidasa, después el zinc en linfocitos, granulocitos y plaquetas, para finalmente descender el zinc sérico. Por tanto, cabe la posibilidad de que nuestros pacientes diabéticos presentaran una deficiencia leve de zinc que podría haberse comprobado determinando la actividad de la enzima 5'nucleotidasa linfocitaria. La deficiencia de zinc en la DM ha sido sugerida por algunos autores (198, 200, 201) que describen hiperzincuria con normo o hipozincemia en los dos tipos de DM, aunque otros autores (202) dudan que exista una deficiencia de zinc en la DM.

En nuestro trabajo llama la atención que las cifras de zincemia sean menores en los grupos terapéuticos que posiblemente presentan una alteración fisiopatológica más grave como causante de su DM; así, los pacientes diabéticos tratados con insulina sin zinc presentan las cifras más bajas de zincemia y los tratados con dieta las cifras más altas. Tal vez estén relacionadas las tasas de zincemia y la gravedad del trastorno

fisiopatológico que causa la DM; ayudaría a confirmar esta hipótesis en pacientes con DMNID, la determinación paralela y simultánea de la zincemia y los cambios en la función de las células beta pancreáticas por medio de la concentración del péptido C.

Los pacientes con DMNID incluidos en esta tesis presentan mayor concentración de porfirinas urinarias y plasmáticas que el grupo control, mientras que ambas concentraciones sólo tienden a incrementarse sin alcanzar significación estadística en los pacientes con DMID.

Aunque escasas, encontramos algunas referencias que describen el aumento de la excreción de porfirinas en orina en pacientes diabéticos (169, 170, 171). En nuestros enfermos, el aumento de la concentración de porfirinas en orina se debe a la presencia de coproporfirina, ya que la fluorescencia máxima se obtiene en longitudes de onda alrededor de 404 nm, similar a la obtenida con coproporfirina pura (404,0-403,8 nm). El aumento de la coproporfirinuria es frecuente en muchas enfermedades (67, 68, 69, 212, 213, 214) como ya indicamos en la introducción y en los comentarios, por tanto es inespecífica, aunque puede contribuir a confirmar la alteración de la ruta del hemo en la DM. También observamos en nuestro trabajo un ligero aumento de la concentración de porfirinas plasmáticas en pacientes con DMNID respecto al grupo control.

La coproporfirinuria observada en la DMNID no se relaciona con el control del metabolismo hidrocarbonado, pero es mayor cuanto más importante es el trastorno fisiopatológico que causa la DM; así la mayor coproporfirinuria se aprecia en el grupo tratado con insulina y la menor en el grupo tratado con dieta, con diferencias significativas entre ambas. Tal vez, la intensidad de la coproporfirinuria podría ayudar a indicar la gravedad del trastorno fisiopatológico que causa la DMNID.

La coproporfirinuria y la concentración de porfirinas plasmáticas en la DMID es mayor cuanto más se incrementa la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad. En DMNID la coproporfirinuria aumenta hasta que los pacientes tienen 65 años y luego disminuye.

En individuos sanos, se ha observado un incremento paralelo de la excreción de porfirinas urinarias y la edad o el peso, aunque sólo si no supera los 16 años de edad o los 30 Kg de peso (214, 215). Esto podría contribuir a explicar la coproporfirinuria observada en los pacientes con DMID, ya que la mayoría presenta una edad y un peso inferiores a 16 años y 30 Kg respectivamente.

CONCLUSIONES

1.- En pacientes con diabetes mellitus detectamos alterada la ruta biosintética del hemo en eritrocitos, con disminución de la actividad de la enzima delta-amino-levulínico-deshidratasa e hiperactividad compensadora de la siguiente enzima, porfobilinógeno-desaminasa. La adición in vitro de zinc y tioles al medio de incubación no consiguió restaurar la actividad de la enzima delta-aminolevulínico deshidratasa hasta tasas normales, lo que probablemente traduce la existencia de una concentración disminuida del fermento, secundaria a síntesis defectuosa y/o a una destrucción acelerada. La hipoactividad de la enzima delta-aminolevulínico-deshidratasa en hematíes tiende a ser más marcada cuanto más acusada y/o prolongada es la alteración del metabolismo hidrocarbonado.

2.- En un modelo experimental de diabetes mellitus inducida por la administración de estreptozotocina, se comprueba también la alteración de la ruta biosintética del hemo, reproduciéndose también el descenso en la actividad y en la cantidad estimada de la enzima delta-aminolevulínico-deshidratasa, tanto en eritrocitos como en tejido hepático.

3.- Por tanto, la determinación de la enzima delta-amino-levulínico-deshidratasa eritrocitaria es un útil parámetro adicional para valorar el control del metabolismo hidrocarbonado en diabetes mellitus.

4.- En pacientes con diabetes mellitus no-insulino-dependiente, la ruta biosintética del hemo parece mostrarse más sensible a las concentraciones séricas de hierro aunque permanezcan dentro de los límites normales. Cuanto mayor es la sideremia o ferritinemia menor es la actividad y la concentración de la enzima delta-amino-levulínico-deshidratasa eritrocitaria.

5.- Las concentraciones de zinc sérico en diabetes mellitus no-insulino-dependiente se sitúan en los límites inferiores de la normalidad y son más bajas cuanto mayor es la gravedad del trastorno fisiopatológico que causa la diabetes mellitus. No hemos observado que exista una relación entre la actividad de las enzimas de la ruta del hemo estudiadas y la concentración del zinc sérico.

6.- Se confirma la presencia de coproporfirinuria moderadamente aumentada en pacientes con diabetes mellitus no-insulino-dependientes; el incremento guarda relación con la gravedad del trastorno fisiopatológico que produce su diabetes y por ello es más acentuado en los enfermos tratados con insulina. La concentración de porfirinas plasmáticas también se eleva muy discretamente en diabetes mellitus no-insulino-dependientes, sin superar los límites normales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- SHEMIN D: The biosynthesis of porphyrins. The Harvey Lectures. Academic Press. Nueva York. 1956: 258-84.
- 2.- RIMINGTON C: Biosynthesis of Haemoglobin. Br. Med. Bull. 1959. 15: 19-26.
- 3.- NEUBERGER A: Aspects of the metabolism of glycine and of porphyrins. Biochem. J. 1961. 78: 1-10.
- 4.- GRANICK S, GILDER H: Distribution, structure and properties of tetrapyrroles. Adv. Enzymol. 1947. 7: 305-15.
- 5.- SHEMIN D, RITTENBERG D: An utilization of glycine for the synthesis of porphyrin. J. Biol. Chem. 1945. 159: 567-83.
- 6.- BLOCH K, RITTENBERG D: An estimation of acetic acid formation in the rat. J. Biol. Chem. 1945. 159:45-52.
- 7.- SHEMIN D, RITTENBERG D: The mechanism of porphyrin formation. The role of the tricarboxylic acid cycle. J. Biol. Chem. 1951. 192: 315-23.
- 8.- LASCELLES J: Synthesis of porphyrins by cell suspensions of tetrahymena vorax. Effect of members of the vitamin B group. Biochem. J. 1967. 66: 65-71.
- 9.- SCHULMAN MP, RICHERT DA: Heme synthesis invitamin B6 and pantothenic acid deficiencies. J. Biol. Chem. 1957. 226: 181-90.

- 10.- AKHTAR M, ABOUD MM, BARNARD G, JORDAN P & ZAMAN Z: Mechanism and stereochemistry of enzymic reactions involved in porphyrin biosynthesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1976. 273: 117-25.
- 11.- GARDNER LC, SMITH SJ, COX TM: Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid and the regulation of heme formation by immature erythroid cell in man. *J. Biol. Chem.* 1991. 266: 22010-18.
- 12.- FUJITA H, YAMAMOTO M, YAMAGAMI T, HAYASHI N, SASSA S: Erythroleukemia differentiation, distinctive responses of erythroid-specific and the nonspecific delta-aminolevulinate synthase mRNA. *J. Biol. Chem.* 1991. 266: 17494-502.
- 13.- CONBOY JG, COX TC, BOTTOMLEY SS, BAWDEN MJ, MAY BK: Human erythroid 5-aminolevulinate synthase, gene structure and species-specific differences in alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* 1992. 267: 18753-758.
- 14.- BHASKER CR, BURGIEL G, NEUPERT B, EMERY-GOODMAN A, KUHN LC, MAY BK: The putative iron-responsive element in the human erythroid 5-aminolevulinate synthase mRNA mediates translational control. *J. Biol. Chem.* 1993. 268: 12699-705.
- 15.- BATLLE AMC: Biosíntesis de los tetrapirroles y su regulación. *Endocr. Clin. Metabol.* 1982. 4:7-20.
- 16.- TSUKAMOTO I, YOSHINAGA T, SANO S: Evidence for histidine as another functional group of delta-aminolevulinic acid dehydratase from beef liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. 67: 294-301.

- 17.- TSUKAMOTO I, YOSHINAGA T, SANO S: Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Int. J. Biochem.* 1980. 12: 751-65.
- 18.- EIBERG H, MOHR J, STAUB-NIELSEN ND: Aminolevulinate dehydratase: sytheny with ABO-AKL-ORM (an assignment to chromosome 9). *Clin. Genet.* 1983. 23: 150-54.
- 19.- WETMUR JG, KAYA AH, PLEWINSKA M, DESNICK RJ: Molecular characterization of the human delta-aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am. J. Hum. Genet.* 1991. 49: 757-63.
- 20.- LOCKWOOD W, RIMINGTON C: Purification of an enzyme converting PBG to porphyrins. *Biochem. J.* 1957. 75: 372-84.
- 21.- JORDAN PM, BURTON G, NORDLOV H, SCHNEIDER MM, PRYDE L, SCOTT IA: Pre-uroporphyrinogen: a substrate for Uroporphyrinogen III Cosynthetase. *J. Chem. Soc. Comm.* 1979: 204-205.
- 22.- BATTERSBY AR, FOOKES CJR, MATCHAM GWJ: Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle. *Nature.* 1980. 285: 17-21.
- 23.- BATLLE AM del C, ROSSETTI MV: Review. Enzymic polymerization of Porphobilinogen into uroporphyrinogens. *Int. J. Biochem.* 1977. 8: 251-65.

- 24.- MEISLER M, WANNER L, EDDY RE, SHOWS TB: The ups locus encoding Uro porphyrinogen I synthase is located on human chromosome 11. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1980. 95: 170-176.
- 25.- CORNFORD P: Transformation of porphobilinogen into porphyrin by preparations from human erythrocytes. *Biochem. J.* 1964. 91: 64-71.
- 26.- JACKSON AH, SANCOVICH HA, FERRAMOLA AM, EVANS N, GAMES DE, MATLIN SA, ELDER GH, SMITH SG: Macrocycles intermediates in the biosynthesis of porphyrins. *Phil. Trans. R. Soc. London b.* 1976. 273: 191-202.
- 27.- ROMEO PH, RAICH N, DUBART A, BEAUPAIN D, PRYOR M, KUSHNER J, COHEN-SOLAL M, GOOSSENS M: Molecular cloning and nucleotide sequence of a complete human Uroporphyrinogen Decarboxylase cDNA, *J. Biol. Chem.* 1986. 261: 9825-31.
- 28.- BATLLE AMC, BENSON A, RIMINGTON C: Purification and properties of coproporphyrinogenase. *Biochem. J.* 1965. 97: 73-82.
- 29.- BATLLE AMC, RIMINGTON C: Estudios sobre la síntesis de la diacrílico deuteroporfirina IX, un posible intermediario en la biosíntesis de protoporfirina IX. *Ciencia Inv.* 1965. 22: 369-75.
- 30.- SANO S: 2,4-Bis (β -hydroxiporpiionnicacid) deutoroporphyrinogen IX, a possible intermediate between coproporphyrinogen III and protoporphyrin IX. *J. Biol. Chem.* 1966. 241: 5276-83.

- 31.- GAMES G, JACKSON AH, JACKSON J: Biosynthesis of protoporphyrin IX from coproporphyrinogen III. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1976: 187-95.
- 32.- ELDER GH, EVANS JO: Evidence that the coproporphyrinogen oxidase activity of rat liver is situated in the intermembrane space of mitochondria. *Biochem. J.* 1978. 172: 345-47.
- 33.- GRANDCHAMP B, WEIL D, NORDMANN Y, VAN CONG N, DE VERNEUIL H, FOUBERT C, GROSS MS: Assignment of the human coproporphyrinogenase oxidase to chromosome 9. *Human. Genet.* 1983. 64: 180-3.
- 34.- POULSON R, POGLASE WJ: The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1975. 250: 1269-73.
- 35.- POULSON R: The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX in mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1976. 251: 3730-41.
- 36.- DEYBACH JC, DA SILVA V, GRANDCHAMP B, NORDMANN Y: The mitochondrial location of protoporphyrinogen oxidase. *Eur. J. Biochem.* 1985. 149: 431-35.
- 37.- JACKSON AH, GAMES DE: The later stages of porphyrin biosynthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1975. 244: 591-97.

- 38.- MCKAY R, DRUYAN R, GETZ GS, RABINOWITZ M: Intramitochondrial localization of delta-aminolevulinatase synthase and ferrochelataase in the rat liver. *J. Bio. Chem.* 1969. 114: 455-63
- 39.- LABBE RF, NIELSEN L: Clinical-biochemical interpretations of erythrocyte protoporphyria. Ferrochelataase-piridoxal phosphate studies. En: *Porphyria in human diseases*. DOSS M (ed). Karger, Basilea. 1976. 141-47.
- 40.- KIKUCHI G, YOSHIDA T: Function and induction of the microsomal Heme-oxygenase. *Mol. Cel. Biochem.* 1983. 53/54: 163-183.
- 41.- ISSELBACHER KJ: Ictericia y hepatomegalia. En: *Harrison Principios de Medicina Interna*. WILSON JD, BRAUNWALD E, ISSELBACHER KJ, PETERSDORF R, MARTIN JB, FAUCI AS, ROOT RK (Eds). McGRAW-HILL Interamérica de España. XII edición. 1991. 315-20.
- 42.- MAY BK, BAWDEN MJ: Control of heme biosynthesis in animals. *Semin. Hematol.* 1989. 26: 150-56.
- 43.- BISSELL DM: Porphyria. En: *Cecil Textbook of Medicine*. WYNGAARDEN JB, SMITH LLH (eds). WB Saunders company. XXVII edición. 1985. 1153-58.
- 44.- SRIVASTAVA G, BROOKER JD, MAY BK, ELLIOT JM: Haem control in experimental porphyria. *Biochem. J.* 1980. 188: 781-8.
- 45.- SRIVASTAVA G, BROOKER JD, MAY BK, ELLIOT JM: Induction of hepatic delta-aminolevulinatase synthase by heme depletion and its possible significance in the control of drug metabolism. *Biochem. Int.* 1980. 1: 64-70.

- 46.- MEYER UA: Porfirias. En: Harrison Principios de Medicina Interna. WILSON JD, BRAUNWALD E, ISSELBACHER KJ, PETERSDORF R, MARTIN JB, FAUCI AS, ROOT RK (Eds). McGRAW-HILL Interamérica de España. XII edición. 1991. 2120-27.
- 47.- PONKA P, SCHULMAN HM, MARTINEZ-MEDELLIN J: Haem inhibits iron uptake subsequent to endocytosis of transferrin in reticulocytes. *Biochem. J.* 1988; 251: 105-9.
- 48.- GADNER LC, COX TM: Biosynthesis of heme in immature erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 1988. 263: 6676-682.
- 49.- PONKA P, SHULMAN HM: Regulation of heme synthesis in erythroid cells by iron delivery from transferrin. En: *Porphyrins and porphyrias*. Nordmann Y (ed). INSERM. Paris 1986. 55-57.
- 50.- LATHROP JT, TIMKO MP: Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science.* 1993. 259: 522-25.
- 51.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA R: Porfirinopatías y porfirias. Puesta al día. *Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.* 1988; 73: 130-37.
- 52.- DOSS M: Enzymatic deficiencies in acute hepatic porphyrias: porphobilinogen synthase deficiency. *Semin. Dermatol.* 1986. 5: 161-68.
- 53.- BIRD TD, HAMERNYK P, NUTTER J, LABBE RF: Inherited deficiency of delta aminolevulinic acid dehydratase. *Am. J. Hum. Genet.* 1979. 31: 662-68.

- 54.- LAMON JM, FRYKHOLM BC, TSCHUDY DP: Family evaluations in acute intermittent porphyria using red cell uroporphyrinogen I synthetase. *J. Med. Genet.* 1979. 16: 134-39.
- 55.- MOORE MR: Porfiria aguda intermitente. *Endocr. Clin. Metabol.* 1983. 5: 7-32.
- 56.- ELDER GH, URQUHART AJ, ENRIQUEZ DE SALAMANCA R, MUÑOZ JJ, BONKOWSKY HL: Immunoreactive Uroporphyrinogen decarboxylase in the liver in porphyria Cutanea Tarda. *Lancet.* 1985. 2: 229-33.
- 57.- DAY RS Y EALES L: Porfiria variegata. *Endocr. Clin. Metabol.* 1983. 5: 34-57.
- 58.- THOMAS WI, KOENIG HM, LIGHTSEY AL, GREEN R: Free erythrocyte porphyrin haemoglobin ratios, serum ferritin and transferrin saturation levels during treatment of infants with iron deficiency anaemia. *Blood.* 1977. 49: 455-62.
- 59.- MOORE MR, GOLDBERG A: Normal and abnormal haem biosynthesis. En: *Iron in biochemistry and medicine.* JACOBS A, WORWOOD M.(eds). Academic Press. Londres 1984. 115-44.
- 60.- FREEDMAN MI, ROSMAN J: A rabbit reticulocyte model for the role of hemin-controlled repressor in hypochromic anaemias. *J. Clin. Invest.* 1976. 57: 594-603.

- 61.- BOTTOMLEY SS: Porphyrin and iron metabolism in sideroblastic anaemia. En: Iron excess; aberrations of iron and porphyrin metabolism. MULLER-EBERHARD U, MESCHER PA, JAFFE ER (eds). Academic Press. Londres 1977. 169-85.
- 62.- COX TC, KOZMAN HM, RASKIND WH, MAY BK, MULLEY JC: Identification of a highly polymorphic marker within intron 7 of the ALAS2 gene and suggestion of at least two loci for X-linked sideroblastic anemia. Hum. Mol. Genet. 1992. 1: 639-41.
- 63.- SASSA S, KAPPAS A, BERNSTEIN SE, ALVARES AP: Heme biosynthesis and drug metabolism in mice with hereditary hemolytic anaemia. J. Biol. Chem. 1979. 254: 729-35.
- 64.- LINKESCH W, STUMMVOLL HK, WOLF A, MULLER M: Heme synthesis in the anemia of the uremic state israel. J. Med. Sci. 1978. 14: 1173-76.
- 65.- LABBE RF, RETTMER RL, SHAN AG, TURNLUND JR: Zinc protoporphyrin: Past, present and future. En: Mechanism of chemical induced porphyriopathies. SILBERGELD EK, FOWLER BA (eds). Ann. N.Y. Acad. Sci. 1987. 514: 7-14.
- 66.- GUERRA P: Alteraciones del metabolismo del hemo en pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento con hemodiálisis. Tesis doctoral. Facultad de Medicina de la Univ. Complutense Madrid. 1990.

- 67.- ARNALICH F, ENRIQUEZ de SALAMANCA R, CATALAN T, MAS V, GARCIA J: Alteraciones del balance excretorio coproporfirina urinaria/coproporfirina fetal en algunas situaciones colestásicas. *Rev. Clin. Esp.* 1979. 155: 13-17.
- 68.- KOSKELO P, MUSTAJOKI P: Altered coproporphyrin isomer excretion in patients with the Dubin-Johnson syndrome. *Int. J. Biochem.* 1980. 12: 975-978.
- 69.- GUERRA P, ENRIQUEZ de SALAMANCA R, TONI P, PERPIÑA J, ENA J, PEREZAGUA C: Estudio de la excreción urinaria de porfirinas en pacientes afectos de hepatopatía crónica. *Gastroenterol. Hepatol.* 1985. 8: 442-449.
- 70.- KOSKELO P, MUSTAJOKI P: Altered coproporphyrin isomer excretion in patients with the Dubin-Johnson syndrome. *Int. J. Biochem.* 1980. 12: 975-78.
- 71.- CAMPBELL BC, BRODIE MJ, THOMPSON GG, MEREDITH PA, MOORE MR, GOLBERG A: Alteractions in the activity of enzymes of haem biosynthesis in lead poisoning and acute hepatic porphyrias. *Clin. Sci. Mol. Med.* 1977. 53: 535-40.
- 72.- MOORE MR, GOLBERG A: Health implications of the hematopoietic effects of lead. En: *Dietary and environmental lead. Human health effects.* MAHAFFEY KR (ed). Elsevier. Amsterdam. 1985. 261-299.
- 73.- MOORE MR, MEREDITH PA, GOLBERG A: Lead and heme biosynthesis. En: *Lead toxicity.* SINGHAL RD, THOMAS JA (eds). Urban and schwartzenberg. Baltimore. 1980. 79-114.

- 74.- EISEMAN JL, ALVARES AP: Alterations induced in haem pathway enzymes and monooxygenases by gold. *Mol. Pharmacol.* 1978. 14: 1176-88.
- 75.- MOORE MR: The effect of ethanol in haem biosynthesis. *Proceeding of the 1st international symposium on alcohol and aldehyde metabolising system.* Estocolmo. 1973. 21-9.
- 76.- McCOLL KEL, THOMPSON GG, MOORE MR, GOLBERG A: Acute ethanol ingestion and haem biosynthesis in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* 1980. 10: 107-112.
- 77.- SINCLAIR JF, ZAITLIN LM, SMITH EL, HOWELL SK, BONKOWSKY HL, SINCLAIR PR: Induction of delta-aminolevulinate synthase by two to five carbons alcohols in cultured chick-embryo hepatocytes. *Biochem. J.* 1986. 234: 405-411.
- 78.- DOSS M, VON TIEPERMANN R, STUTZ G, TESCHKE R: Alcohol induced decrease in uroporphyrinogen decarboxylase activity in rat liver and spleen. *Enzyme.* 1981. 26: 24-31.
- 79.- SURMEN E, ERYUREK FG: Liver delta-aminolevulinate dehydratase activity in amitriptyline or chlorpromazine-treated rats. *Toxicology.* 1992. 75: 63-9.
- 80.- MUÑOZ GONZALEZ JJ: Trastornos de la biosíntesis del hemo inducidos por la carbamazepina. Tesis doctoral. Universidad Complutense, Facultad de Medicina. Madrid 1988.

- 81.- EXPERT COMMITTEE ON DIABETES MELLITUS. OMS. Technical Report Series N° 646 (1980).
- 82.- SHUMAN CR: Diabetes Mellitus: Definition, clasificación, and diagnosis. En: Diabetes Mellitus. Galloway, Potvin, Shuman (eds). Lilly Research laboratories. Indianapolis, Indiana 1988.
- 83.- SERRANO RIOS M, SEVERINO R Y ORDOÑEZ PEREZ A: Diabetes Mellitus. Concepto y sistematización. Endocr. clin. metabol 1982. 7-15.
- 84.- World Health Organization Technical Report Series (WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: Second report) Ginebra 1980. 646.
- 85.- Diabetes Mellitus. Report of a WHO Study Group. Technical Report Series 727. World Health Organization, Ginebra 1985.
- 86.- DE SANTIAGO M: Clasificación y diagnóstico de diabetes mellitus. En: Diabetes Mellitus en la práctica médica. ELA y grupo ARAN (eds). Madrid. 1992. 59-82.
- 87.- FOSTER DW: Diabetes mellitus. En: Harrison Principios de Medicina Interna. WILSON JD, BRAUNWALD E, ISSELBACHER KJ, PETERSDORF R, MARTIN JB, FAUCI AS, ROOT RK (Eds). MCGRAW-HILL Interamérica de España. XII edición. 1991. 2120-27.
- 88.- DIABETES MELLITUS. OMS: Serie de Informes Técnicos N° 727 (1985) 10-26.

- 89.- NATIONAL DATA GROUP: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 1979. 28: 1039-57.
- 90.- ALLEN DW, SCHOROEDER WA, BALOG J: Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 1958. 80: 1628-34.
- 91.- RAHBAR S: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta*. 1968. 22: 296-98.
- 92.- MARAÑES PALLARDO JP: Valoración de diversos parámetros en la diabetes mellitus. En: *Avances en diabetes*. ELA (eds). Madrid 1991, pag 79-86.
- 93.- MARAÑES PALLARDO JP: Concepto y epidemiología de la diabetes. En: *Avances en diabetes*. ELA (eds). 1991; pag 15-24.
- 94.- PAISEY R, MACFARLANE D, SHERRIFF R, HARTOG M, SLADE R, WHITE D: The relationship between blood glycosylated hemoglobin and home capillary blood glucose levels in diabetics. *Diabetologia*. 1980. 19: 31-34.
- 95.- KOENIG R, PETERSON C, JONES R, SAUDEK C, LEHRMAN M, CERAMI A: Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1976. 295: 417-20.
- 96.- BLOHME G: Glycosylated haemoglobin in clinical practice. *Acta Med. Scand.* 1983; 213: 47-52.

- 97.- NATHAN DM, SINGER DE, HURXTHAL K, et al: The clinical information values of the glycosylated hemoglobin assay. *N. Engl. J. Med.* 1984. 310: 341-50.
- 98.- KENNEDY L: Labile glycosylated haemoglobin-is it clinically important?. *Diabetic Med.* 1985; 2: 86-7.
- 99.- LARRODERA L, YAGÜE M, HAWKINS F: Fructosamina. Jornada sobre glicosilación no enzimática en la diabetes mellitus. *Menarini Diagnósticos.* Madrid 1987; 43-49.
- 100.- BAKER JR, JOHSON RN, SCOTT DJ: Serum fructosamine concentrations in patients with type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus during changes in management. *Br. Med. J.* 1984. 288: 1484-86.
- 101.- RATZMANN KP, STRESE J, KOHNERT KD, JAHR D, MICHAELIS D: Age-dependent relationship of fasting C-peptide concentration and insulin secretion in non-obese subjects with normal glucose tolerance. *Clin. Exp. Endocrinol.* 1986. 88: 57-63.
- 102.- OLEFSKY JM: Diabetes mellitus. En: *Cecil Textbook of Medicine.* WYNGAARDEN JB, SMITH LLH (eds). WB Saunders company XXVII edición. 1985. 1320-41.
- 103.- REUNANEN A, AKERBLOM HK, KAAR ML: Prevalence and ten year incidence of insuli-dependent diabetes mellitus in children and adolescents. *Acta paediatr Scand.* 1982. 71: 893-99.

- 104.- FLEEGER FM, ROGERS K, DRASH A: Age, sex and season onset of juvenile diabetes in different geographic areas. *Pediatrics*. 1979. 63: 374-9.
- 105.- O'RAHILLY S, TURNER RC: Early onset tipe II diabetes y MODY: evidence for the existence of two discrete diabetic syndrome. *Diabetic Med*. 1988. 5: 224-34.
- 106.- FAJANS SS: Heterogeneity between various families with non-insulin-dependent diabetes in the MODY type. En: *The genetics of diabetes mellitus*. Kobberling J, Tattersall R (eds). Academic Press, Londres. 1982. 251-60.
- 107.- SERRANO RIOS M, MOY CS, MARTIN SERRANO R, MINUESA ASENSIO A, DE TOMAS LABAT ME, ZARANDIETA ROMERO G Y HERRERA J: Incidence of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in subjets 0-14 years of age in the Comunidad of Madrid, Spain. *Diabetología*. 1990. 33: 422-24.
- 108.- SANCHEZ DEL POZO J, LLEDO VARELA G, BARRIONUEVO JL Y GALLEG0 GOMEZ ME. Clínica y procedimientos diagnósticos. En: *Pediatría, Diabetes en la infancia (I)*, 1988. 52: 22-30.
- 109.- LESLIE RDG, VOLKMANN NP, PONCHER M, HANNING I, ORSKOV H, ALBERTI KGMM: Metabolic abnormalities in children of non-insulin-dependent diabetics. *Br. Med. J*. 1986. 293: 840-42.
- 110.- DE LEIVA A: Caracterización de los estadíos precoces de la diabetes mellitus insulin-dependiente. *Av. Diabetol*. 1988. 1: 39-53.

- 111.- DE LEIVA A, MAURICIO D: Avances en la etiopatogenia de la diabetes mellitus. An. Med. Intern. 1991; 8: 63-8.
- 112.- KARJALAINEN J, SALMELA P, ILONEN J, SURCEL H-M, KNIP M: A comparison of childhood and adult type I diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 1989; 320: 881-86.
- 113.- DE SANTIAGO M y col: Diabetes en el niño y en el viejo. En: Diabetes Mellitus en la práctica médica II. Ela y ARAN (eds). 1992. 527-57.
- 114.- DE FRONZO RA. Glucose intolerance in aging: evidence for tissue insensitivity to glucose. Diabetes. 1979. 28: 1095-1101.
- 115.- ROSE JW, MINAKER KL, PALLOTTA JA. Characterization of insulin resistance of aging. J. Clin. Invest. 1983. 71: 1581-87.
- 116.- GALTON DJ, HITMAN GA: DNA Polymorphisms and the insulin gene: disease associations. Diabetic Med. 1985. 2: 159-62.
- 117.- GROOP LC AND OTHERS: Association between polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 1993. 328: 10-14.
- 118.- KOBBERLING J, TILLIL H, LORENZ HJ: Genetics of type 2A -and type 2B- diabetes mellitus. Diabetes Res. Clin. Pract. (abstract) 1985; 1: 311-20.
- 119.- BARNET AH, EFF C, LESLIE RDG, PIKE DA: Diabetes in identical twins. Diabetología. 1981. 20: 87-93.

- 120.- OPIE E: The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas: hyaline degeneration of the islets of Langerhans. *J. Exp. Med.* 1901. 5: 527-40.
- 121.- CLARK A, WELLS CA, BULEY D et al: Abnormal proportions of three pancreatic endocrine cells types and islet amyloid deposition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetología* 1986; 36: 528 A.
- 122.- POLONSKY KS, GIVEN BD, HIRSCH LJ, TILLIL H, SHAPIRO ET, BEEBE C, FRANK BH, GALLOWAY JA, VAN CAUTER E: Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1988. 37: 1595-1607.
- 123.- KOLTERMAN OG, GRAY S, INSEL JR, BORSTEIN P, GRIFFIN J, OLEFSKY JM: Mechanisms of insulin resistance in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes* 1980. 29: 16A.
- 124.- HERR RR, EBLE TE, BERGY ME, JAHNKE HK: Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiotics Annual, New York, Antibiotica, Inc.* 1959-1960. 236-240.
- 125.- RAKIETEN N, RAKIETEN ML, NADKARNI MV: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer* 1963. 29: 91-98.
- 126.- RERUP CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 1970. 22: 485-518.
- 127.- GANDA OP, ROSSINI AA, LIKE AA: Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 1976. 25: 595-603.

- 128.- ARIZNAVARRETA C, FERNANDEZ-DURANGO R: Influence of streptozotocin-induced diabetes on immunoreactive somatostatin in the retina and blood: effect of insulin treatment. *J. Endocrinol.* 1987. 114: 363-367.
- 129.- MAYOR P, CALLE C: Efecto de la estreptozotocina a nivel pre-receptor, receptor y post-receptor de insulina en adipocitos de rata. *Rev. Esp. Fisiol.* 1987. 43: 445-454.
- 130.- MAYOR P, CALLE C: Glucagon binding and lipolytic response in isolated adipocytes from streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinol. Japon.* 1988. 35: 207-215.
- 131.- FOSTER DW, McGARRY JD: Metabolismo intermediario de carbohidratos, lípidos y proteínas. En: *Harrison Principios de Medicina Interna*. PETERSDORF RG, ADAMS RD, BRAUNWALD E, ISSELBACHER KJ, MARTIN JB, WILSON JD (Eds). McGRAW-HILL Interamérica de España. X edición. 1986. 677-684.
- 132.- STERLING K, SILVER M, RICKETTS HT: Development of porphyria in diabetes mellitus; report of three cases. *Arch. Int. Med.* 1949. 84: 965-75.
- 133.- BERMAN J, BIELICKY T: Einige äußere faktoren in der ätiologie der porphyria utanea tarda und des diabetes mellitus mit besonderer berücksichtigung der syphilitischen infection und ihrer behandlung. *Dermatologica.* 1956. 113: 78-87.

- 134.- LIM HW, COOPER D: The porphyrias. En: Principles and Practice of Dermatology. SAMS WM, LYNCH P (eds). Churchill Livingstone inc. 1990. 707-14.
- 135.- HARBER CL: Porphyria cutanea tarda. En: Clinical Dermatology. DEMIS DJ, DOBSON RL, McGUIRE J (eds). Harper Row, New York. 1976. Unit 12-15.
- 136.- BICKEDRS DR, PATHAK MA: Las porfirias. En: Dermatología en Medicina General. FITZPATRICK TB, EISEN AZ, WOLFG K, FREEDBERG IN, AUSTEN KF (eds). Panamérica Macgraw-Hill, 3ª edición. 1987. 1842-96.
- 137.- PYE RJ, BLACK M, WEISMANN: Metabolic and nutritional disorders. En: Textbook of Dermatology. ROOK A, WILKINSON DS, EBLING FJG, CHAMPION RH, BURTON JL (eds). Blackwell scientific publications, Londres. 1986. 2271-342.
- 138.- FRANKS AG, PULUNI M, BICKERS DR, RAYFIELD EJ, HARBER LC: Carbohydrate metabolism in porphyria cutanea tarda. Am. J. med. Sci. 1979. 277: 163-71.
- 139.- LENCZNER JM, STELLA AM, PARERA VE, MILANO R, SPINA O, MAGNIN PH, BATLLE AMC: Estudios de la delta aminolevulínico dehidratasa y otros metabolitos del hemo en pacientes porfíricos y diabéticos. Rev. Arg. Derm. 1989. 70: 143-49.
- 140.- ROOK A, CHAMPION RH: Porphyria cutanea tarda and diabetes mellitus. Br. Med. J. 1960. 19:860-1.

- 141.- GROSSMAN ME, BICKERS DR, POH-FITZPATRICK MB, DELEO VA, HARBER LC: Porphyria cutanea tarda clinical features and laboratory finding in 40 patients. *Am. J. Med.* 1979. 67: 277-86.
- 142.- LISI P, SANTEUSANIO F, LOMBARDI G, COMPAGNUCCI P: Carbohydrate metabolism in porphyria cutanea tarda. *Dermatologica.* 1983. 166: 287-93.
- 143.- WAXMAN AD, SCHALCH DS, ODELL WD, TSCHUDY DP: Abnormalities of carbohydrate metabolism in acute intermittent porphyria. *Am. Soc. Clin. Inves.* 1967. 46: 1129-29.
- 144.- STEIN JA, TSCHUDY DP: Acute intermittent porphyria, a clinical and biochemical study of 46 patients. *Medicine.* 1970. 49: 1-16.
- 145.- DOSS M, VERSPOHL F: The "glucose effect" in acute hepatic porphyrias and in experimental porphyria. *Klin. Wochenschr.* 1981. 59: 727-35.
- 146.- BONKOVSKY HL, HEALEY JF, LOURIE AN, GERRON GG: Intravenous heme-albumin in acute intermittent porphyria: evidence for repletion of hepatic hemoproteins and regulatory heme pools. *Am. J. Gastroenterol.* 1991. 86: 1050-56.
- 147.- ROSE JA, HELLMANN ES, TSCHUDY DP: Effect of diet on induction of experimental porphyria. *Metabolism.* 1961; 10: 514-21.
- 148.- TSCHUDY OP, WELLAND FH, COLLINS A, HUNTER G: The effect of carbohydrate feeding on the induction of delta-aminolevulinic acid synthetase. *Metabolism.* 1964. 13: 396-405.

- 149.- BONKOVSKY HL, COLLINS A, DOHERTY JM, TSCHUDY DP: The glucose effect in rat liver: studies of delta-aminolevulinate synthase and tyrosine amino-transferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. 320: 561-76.
- 150.- KNUDSEN MKB, SPARBERG CM, LECOQO LCF: Porphyrinuria precipitated by fasting. *N. Engl. J. Med.* 1967. 277: 350-1.
- 151.- KOSKELO P, PELKONEN R: Porphyrinuria induced by fasting. *N. Engl. J. Med.* 1968. 278: 856-56.
- 152.- AGYALOURIS, SARAPTIS: Effect of diabetes on porphyric attacks. *Br. Med. J.* 1987. 295:1237-8.
- 153.- PATTEN CJ, NING SM, LU AYH, YANG CS: Acetone-inducible cytochrome P-450: Purification, catalytic activity and interaction with cytochrome b5. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986. 251: 629-38.
- 154.- DANNAN GA, GUENGERICH FP, WAXMAN DJ: Hormonal regulation of rat liver microsomal enzymes: role of gonadal steroids in programming, maintenance, and suppression of delta-4-steroid 5-alpha-reductase, flavin-containing monooxygenase and sex-specific cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 1986. 261: 10728-10735.
- 155.- GUENGERICH FP: Enzymology of rat liver cytochrome P-450. In: *Mammalian cytochromes P-450.* GUENGERICH FP (ed). CRC Press, Boca Raton, FL. 1987. Vol I: 1-54.

- 156.- YANG CS, LU AYH: The diversity of substrates for cytochrome P-450. En: Mammalian cytochromes P-450. GUENGERICH (ed). CRC Press Boca Raton, FL. 1987. Vol II: 1-18.
- 157.- BITAR M, WEINER M: Diabetes-induced metabolic alterations in heme synthesis and degradation and various heme-containing enzymes in female rats. *Diabetes*. 1984. 33: 37-44.
- 158.- KATO R, ONODA K, TAKANAKA A: Species differences in drug metabolism by liver microsomes in alloxan diabetic or fasted animal. I: The activity of drug-metabolizing enzymes and electron transport system. *Jpn. J. Pharmacol.* 1970. 20: 546-61.
- 159.- REINKE LA, STOHS SJ, ROSENBERG H: Altered activity of hepatic mixed-function mono-oxygenase enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Xenobiotica*. 1978. 8: 611-19.
- 160.- REINKE LA, STOHS SJ, ROSENBERG H: Increased aryl hydrocarbon hydroxylase activity in hepatic microsomes from streptozotocin diabetic female rats. *Xenobiotica*. 1978. 8: 769-78.
- 161.- BARNETT CR, RUDD S, FLATT PR, IOANNIDES C: Sex differences in the diabetes-induced modulation of rat hepatic cytochrome P450 proteins. *Biochem. Pharm.* 1993. 45: 313-19.
- 162.- QIANG MA, GHAZI AD, GUENGERICH FP, YANG CS: Similarities and differences in the regulation of hepatic cytochrome p-450 enzymes by diabetes and fasting in male rats. *Biochem. Pharm.* 1989. 38: 3179-84.

- 163.- BARNETT CR, GIBSON GG, WOLF CR, FLATT PR, IOANNIDES C: Induction of cytochrome P 450III and P450IV family proteins in streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. J.* 1990. 268: 765-69.
- 164.- BELLWARD GD, CHANG T, RODRIGUES B, McNEILL JH, MAINES S, RYAN DE, LEVIN W, THOMAS PE: Hepatic cytochrome P450j induction in the spontaneously diabetic BB rat. *Mol. Pharmacol.* 1988. 33:140-3.
- 165.- CANEPA ET, GALVAGNO MA, LLAMBIAS EBC, PASSERON S, GRINSTEIN M: Studies on regulatory mechanisms of heme biosynthesis in hepatocytes from experimental-diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. 847:191-97.
- 166.- CANEPA ET, LLAMBIAS EBC, GRINSTEIN M: Studies on regulatory mechanisms of heme biosynthesis in hepatocytes from normal and experimental-diabetic rats. Role of cAMP. *Biochem. Cell. Bol.* 1989. 67:751-58.
- 167.- POLO CF, CIRIGLIANO A, NAVONE NM, GARRO JC, ROSSETTI MV, WIDER EA: Haem biosynthesis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Mol. Aspects med.* 1990. 11: 29-29.
- 168.- GARRO JC, POLO CF, CIRIGLIANO A, ROSSETTI MV, WIDER EA: Glucose effect on haem metabolism. *Mol. Aspects med.* 1990. 11: 28-28.
- 169.- BERMAN J: Porphyrie und Zuckerkrankheit: Aufsuchen der porphyrie bei zuckerkranken. *Z. Ges. Inn. Med.* 1956. 11:186-88.

- 170.- GOERZ G, KORDA S: Porphyrin cutanea tarda und diabetes mellitus. Z. Hautkr. 1977. 52: 1165-74.
- 171.- LATOTZKI H: Zum vorkommen von porphyrie bei diabetes mellitus. Z. Ges. Inn. Med. 1959. 14: 785-87.
- 172.- POLO C, VAZQUEZ E, GEREZ E, CABALLERO F, BATLE A: Fhurther studies on the non-enzymatic glycosilation of ALA-D, PBG-D and rhodenase. Abstrac International Conference of Porphyrins, Porphyria and Photodynamic therapy. Melbourne. Australia. Noviembre 1993.
- 173.- DuBOID EF: Basal metabolism in Health and disease. Lea y Febiger, Philadelphia. 1936. Copyright 1920 de BOOTHBY WM y SANDIFORD RB.
- 174.- CANEPA ET, LLAMBIAS EBC, GRINSTEIN M: Studies on induction of delta-aminolevulinic acid synthase, ferrochelataze, cytochrome p-450 and cyclic AMP by phenformin. Bioch. Pharmacol. 1990. 40: 365-72.
- 175.- JAIN SK, LEVINE SN, DUETT J, HOLLIER B: Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. Metabolism. 1990. 39:971-75.
- 176.- BERLIN A, SCHALLER KM: European standardized method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity inblood. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1974. 12: 389-390.

- 177.- FUJITA H, ORII Y, SANO S: Evidence of increased synthesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead poisoned rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. 678: 39-50.
- 178.- GRANICK JL, SASSA S, GRANICK S, LEVERE RD, KAPPAS A: Studies in lead poisoning: Correlations between the ratio of activated and inactivated ALA-D of whole blood and the lead level. *Biochem Med.* 1975. 8: 149-159.
- 179.- DAVIS JR, AVRAM MJ: A comparison of stimulating effects of cadmium and zinc on normal and lead-inhibited human erythrocytic delta-aminolaevulinic acid dehydratase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1978. 44:181-90.
- 180.- ANDERSON PM, DESNICK RJ: Porphobilinogen deaminase: Methods and principles of the enzymatic assay. *Enzyme.* 1982. 28: 146-157.
- 181.- PIOMELLI S, DAVIDOW B, GUINEE V ET AL. The FEP (Free Erythrocyte Porphyrins) test. A screening micromethod for lead poisoning. *Pediatrics.* 1973. 51: 254-259.
- 182.- WESTERLUND J, PUDEK M, SCHREIBER WE: A rapid and accurate spectrofluorometric method for quantification and screening of urinary porphyrins. *Clin. Chem.* 1988. 34: 345-351.
- 183.- GRANDCHAMP B, DEYBACH JC, GRELIER M, DE VERNEUIL H, NORDMANN Y: Studies of porphyrin synthesis in fibroblasts of patients with congenital erythropoietic porphyria and one patient with homozygous coproporphyrin. *Biochim. Biophys Acta.* 1980. 629: 577-586.

- 184.- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR ALL, RANDALL RJ: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193: 265-275.
- 185.- DOMENECH JM, RIBA MD: Contrastes a priori y a posteriori. Comparaciones múltiples. En: Documentos del laboratorio de psicología matemática. Univ Autónoma de Barcelona. 1985. 5-15.
- 186.- SACHS L: The comparison of independent data samples. En: Applied statistics a handbook of techniques. Springer-Verlag (eds) New York Inc 1984. 303-6.
- 187.- MURAKAMI K, KONDO T, OHTSUKA Y, FUJIWARA Y, SHIMADA M and KAWAKAMI Y: Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism.* 1989. 38: 753-758
- 188.- McLENNAN S, HEFFERNAN S, WRIGHT L, RAE C, FISHER E, YUE DK, TURTLE JR: Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes.* 1991. 40: 344-48.
- 189.- BRIDGES KR, BUNN HF: Anemias con alteración del metabolismo del hierro. En: Harrison Principios de medicina interna. WILSON JD, BRAUNWALD E, ISSELBACHER KJ, PETERSDORF RG, MARTIN JB, FAUCI AS, ROOT RK (Eds). McGRAW-HILL Interamérica de España. XII edición. 1991. 1761-66.
- 190.- BONKOVSKY HL: Iron and the liver. *Am. J. Med. Sci.* 1991. 301: 32-43.

- 191.- BONKOVSKY HL: Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias. En: Hepatology: A Textbook of Liver Disease. ZAKIM D, BOYER T.D. (eds) W.B. Saunders, 2 Ed. Philadelphia 1990. 378-423.
- 192.- BONKOVSKY HL, SINCLAIR PR, SINCLAIR JF: Hepatic heme metabolism and its control. Yale J. Biol. Med. 1979. 52:13-37.
- 193.- BONKOVSKY HL, HEALEY JF, SINCLAIR PR, ELDER GH, SINCLAIR JF, SHEDLOFSKY SI: Iron and the liver. Acute effects of iron-loading on hepatic heme synthesis of rats. The role of decreased activity of 5-aminolevulinate dehydrase. J. Clin. Invest. 1983. 71: 1175-82.
- 194.- BONKOVSKY HL, HEALEY JF, LINCOLN B, BACON BR, BISHOP DF, ELDER GH: Hepatic heme synthesis in a new model of experimental hemochromatosis: Studies of rats fed finely divided elemental iron. Hepatology. 1987. 7: 1195-1203.
- 195.- BONKOVSKY HL: Mechanism of iron-potentialiation of hepatic uroporphyrin: Studies in cultured chick embryo liver cells. Hepatology. 1989. 10: 354-64.
- 196.- MORAN JIMENEZ MJ: Desarrollo de porfiria cutánea tarda experimental, inducida por hexaclorobenceno en roedores sideróticos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid 1993.
- 197.- FERNANDEZ B. de QUIROS J, IÑIGUEZ C, CARRERAS J: Metabolismo del cinc y su significado biológico. Rev. Clin. Esp. 1978. 151: 1-7.

- 198.- HAGGLOF B, HALLMANS G, HOLMGREN G, LUDVIGSSON J, FAIKMER S: Prospective and retrospective studies of zinc concentrations in serum blood clots, hair and urine in young patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta endocrinol.* 1983. 102: 88-95.
- 199.- McNAIR P, KIILERICH S, CHRISTIANSEN C, CHRISTIANSEN MS, MADSBAD S, TRANSBOL I: Hiperzincuria in insulin treated diabetes mellitus-its relation to glucose homeostasis and insulin administration. *Clin Chim. Acta.* 1981. 112: 343-8.
- 200.- KINLAW WB, LEVINE AS, MORLEY JE, SILVIS SE, McCLAIN CJ: Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 1989. 75: 273-7.
- 201.- CANFIELD WK, HAMBIDGE KM, JOHNSON LK: Zinc nutriture in type I diabetes mellitus: relationship to growth measures and metabolic control. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr* 1984. 8: 577-84
- 202.- MELCHIOR T, SIMONSEN KW, JOHANNESSEN AC, BINDER C: Plasma zinc concentrations during the first 2 years after diagnosis of insulin-dependent diabetes mellitus: a prospective study. *J. Intern. Med.* 1989. 226: 53-8.
- 203.- SANDSTEAD HH: Assessment of zinc nutriture. *J. Lab. Clin. Med.* 1991. 118: 299-300.
- 204.- MEFTAH S, PRASAD AS, LEE DY, BREWER J: Ecto 5' nucleotidase [5'NT] as a sensitive indicator of human zinc deficiency. *J. Lab. Clin. Med.* 1991. 118: 309-16

- 205.- BEVAN DR, BODLADNDER P, SHEMIN D: Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn⁺⁺ for enzyme activity. J. Biol. Chem. 1980. 255: 2030-35.
- 206.- LOCKWOOD WH, BENSON A: The enzymic condensation of porphobilinogen to porphyrins. Biochem. J. 1960. 75: 372-81.
- 207.- TIPPING E, KETTERER B, KOSKELO P: The binding of porphyrins by ligandin. Biochem. J. 1978. 169: 509-16.
- 208.- MORGAN WT, SUTOR RP, MULLER-EBERHARD U, KOSKELO P: Interaction of rabbit hemopexin with copro and uroporphyrins. Biochem. biophys. Acta. 1975. 400: 415-22.
- 209.- MAUZERALL D, GRANICK S: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. J. Biol. Chem. 1958. 232: 1141-48.
- 210.- GRANDAL M: Estudio de la excreción urinaria de porfirinas en una amplia muestra de la población general de Madrid; Screening de porfirias: prevalencia de la porfiria cutánea tarda. Tesis doctoral. Facultad de Medicina de la Univ. Complutense. Madrid 1992.
- 211.- RIMINGTON C: Haems and porphyrins in health and disease. Acta Med. Scand. 1952. 143: 177-96.
- 212.- LYBERATOS C, PAPADOPOULOS E, PAPASTERADIS C, MITSIOU A, PHILIPPIDOU A, GARDIKAS C: Urine porphyrins and their precursors in homozygous beta-thalassaemia. Acta Haemat. 1975. 54: 95-97.

- 213.- McCOLL KEL, GOLDBERG A: Abnormal porphyrin metabolism in diseases other than porphyria. *Clin. Haematol.* 1980. 9: 427-444.
- 214.- BLOOM KE, ZAIDER EF, MORLEDGE LJ, POH-FIZPATRICK MB: Urinary porphyrin excretion in normal children and adults. *Am. J. Kidney Dis.* 1991. 18: 483-89.
- 215.- HSIA DY-Y, PAGE M: Coproporphyrin studies in children. I. urinary coproporphyrin excretion in normal children. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954. 85: 86-88.
- 216.- ENRIQUEZ de SALAMANCA R, PEÑA ML, CHINARRO S, OLMOS A, MINGO D, MOLINA C, MUÑOZ JJ: Quantitative and qualitative porphyrin excretion in normal subjects. *Int. J. Biochem.* 1982. 14: 251-54.
- 217.- KANENO K: Disturbances of haem synthesis in iron deficiency anaemia. *Acta Haem. Japon.* 1970. 33: 857-66.
- 218.- TAKAKU F, YANO Y, AOKI Y, NAKAO K, WADA O: Delta-aminolaevulinic acid synthetase activity of human bone marrow erythroid cells in various haematological disorders. *Tohoku J. Exper. Med.* 1972. 107:217-28.
- 219.- PAOLISSO G, MARO G, PIZZA G, AMORE A, SGAMBATO S, TESAURO P, VARRICCHIO M, ONOFRIO F: Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy y subjects and non-insulin-dependent diabetics. *Am. J. Physiol.* 1992. 263: E435-E440.

- 220.- DJORDJEVIC VB, STRAHINJIC S, KORACEVIC D, MILJKOVIC P, DJORDJEVIC V, PAVLOVIC D, STEFANOVIC V: Erythrocyte delta-aminolevulinate dehydratase measurements in balkan endemic nephropathy. *Kidney. int.* 1991. 40: S-93-6.
- 221.- DJORDJEVIC VB: delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes of diabetic patients. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 1985. 93:285-90.
- 222.- CHALEVELAKIS C, LYBERATOS C, MONOPOULOS D, PYROVOLAKIS J, GARDIKAS C: Erythrocyte delta-aminolaevulinic acid dehydratase, urinary porphyrins and porphyrin precursors in iron deficiency anaemia. *Acta Haematol.* 1977. 57: 305-9
- 223.- CAMPBELL BC, MEREDITH PA, MOORE MR, GOLDBERG A: Erythrocyte delta-aminolaevulinic acid dehydratase activity and changes in delta-aminolaevulinic acid concentrations in various forms of anaemia. *British J. Haematol.* 1978. 40: 397-400.
- 224.- McCOLL KEL, MOORE MR, THOMPSON GG, GOLDBERG A: Haem enzymes in peripheral blood cells of patients with iron deficiency anaemia before and after treatment. *British J. Haematol.* 1979. 50: 584-95.