

UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

**ESTUDI DE LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA EN
ELS FAMILIARS DELS PACIENTS DIABÈTICS
TIPUS 2 I DELS CANVIS INDUÏTS PER LA
METFORMINA**

Josefina Biarnés i Costa
Barcelona / Girona, 2006

UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Programa de Doctorat: Investigació Fisiopatològica General de la Malaltia.

Bienni: 1992-1994

Aquesta Tesi Doctoral titulada: “ESTUDI DE LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA EN ELS FAMILIARS DELS PACIENTS DIABÈTICS TIPUS 2 I DELS CANVIS INDUÏTS PER LA METFORMINA” es presenta per la llicenciada Josefina Biarnés i Costa per optar al grau de Doctor en Medicina.

Ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Joan Soler Ramon i codirigida pel Dr. Miquel Fernández Castañer i el Dr. José Manuel Fernández-Real Lemos.

Josefina Biarnés i Costa

AGRAÏMENTS

Al Dr Joan Soler, Cap del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Universitari de Bellvitge, director d'aquesta tesi per haver conduït com un veritable mestre els meus primers anys de l'endocrinologia i aquest projecte.

Al Dr. Miquel Fernández-Castañer codirector d'aquesta tesi, pel tot el seu suport i orientació al llarg d'aquest treball.

Al Dr. José Manuel Fernández-Real codirector d'aquesta tesi pel seus consells que m'han guiat en el seu desenvolupament.

Al Dr. Wifredo Ricart, Cap de la Unitat d'Endocrinologia, Diabetis i Nutrició de l'Hospital Dr. Josep Trueta pel seu recolzament i empenta al llarg d'aquests anys.

A tot l'equip del laboratori de recerca de l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona i a la Dra. Roser Casamitjana i el Dr. Joan Vendrell que han intervingut en la quantificació de moltes variables de laboratori.

A la Dra. Maria del Mar Garcia pel seu inestimable ajut en l'anàlisi estadística de les dades.

A les infermeres: Roser, Antònia i Àlícia de l'Hospital de Bellvitge i en els darrers anys les infermeres del laboratori i de la 7ena A de l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona que van participar en la realització de les proves funcionals.

Agrair igualment a tots els companys de residència i metges adjunts de l'Hospital de Bellvitge i un record especial per la Isabel Camps, per tot el que vam compartir.

A tots els companys i companyes de la UDEN que m'han ajudat sempre que els he necessitat.

A la meva família: pares, germana i cunyats per la seva ajuda i comprensió.

I sobretot gràcies al Luis, l'Albert i en Joan per tot.

ABREVIATURES

Acpr30: Adipocitocina relacionada amb el complement de 30 KDa
ADA: Societat americana de diabetis
ADP: Adenosín difosfat
AGB: Alteració de la glucosa basal
AGL: Àcids grassos lliures
ALT: Alanina aminotransferasa
AST: Aspartat aminotransferasa
AMP: Adenosín monofosfat
AMPK: Proteincinasa activadora de l'AMP
ATP: Adenosín trifosfat
ATP III: Tercer pannel de tractament de l'adult
ARIC: Estudi del risc arterioscleròtic a comunitats
BPI: Proteïna bactericida incrementadora de la permeabilitat
CIGMA: Infusió contínua de glucosa amb valoració segons el model (*Continuous infusion of glucose with model assessment*)
DS: Desviació estandar
DPP: Programa per la prevenció de la diabetis (Diabetes Prevention Program)
EGIR: Grup europeu per l'estudi de la resistència a la insulina
FA: Fosfatasa alcalina
FAK: Cinasa d'adhesió focal
GLP-1: Pèptid 1 similar al glucagó
GLUT: Transportador de glucosa
GGT: γ -glutamilttransferasa
Grb2: Proteïna d'unió 2 del receptor del factor de creixement
HbA1c: Fracció 1c de l'hemoglobina glicosilada
HDL: Lipoproteïnes d'alta densitat
HOMA: Homeostasi segons el model (*Homeostasis model assessment*)
HOPE: Estudi d'avaluació de la prevenció d'esdeveniments cardíacs
HTA: Hipertensió arterial
IKK: Cinasa inhibidora del factor nuclear κ B
IL: Interleucina
IMC: Índex de massa corporal
IRS: Substrat del receptor d'insulina
iv: intravenós
IVGTT: Test intravenós de tolerància a la glucosa
JNK: Cinases amino terminals c-Jun
KDa: Kilodaltons
LAR: Tirosín fosfatasa relacionada amb l'antigen leucocitari
LBP: Proteïna fixadora del LPS
LDL: Lipoproteïnes de baixa densitat
LIFE: Estudi d'intervenció amb losartan per la reducció d'esdeveniments
LKB1: Proteïna treonina cinasa 1
LPS: Lipolisacàrid bacterià
MAP: Proteïnes activades per mitògens

mTOR: Proteïna de mamífers d'unió a la rapamicina
NCEP: Programa nacional d'educació del colesterol
NF- κ B: Factor nuclear κ B
OMS: Organització mundial de la salut
PA: Pressió arterial
PAD: Pressió arterial diastòlica
PAI-1: Inhibidor 1 de l'activador del plasminògen
PAS: Pressió arterial sistòlica
PI 3-cinasa: Fosfatdilinositol 3 cinasa
PKB/akt: Proteïna cinasa B
PKC: Proteïna cinasa C
PPAR- γ : Receptor γ de l'activador de la proliferació dels peroxisomes
RIA: Radioimmunoassaig
SHBG: Globulina transportadora de les hormones sexuals
sTNFR1: Fracció soluble del receptor 1 del TNF- α
sTNFR2: Fracció soluble del receptor 2 el TNF- α
TNF- α : Factor de necrosi tumoral alfa
TAC: Tolerància alterada a la glucosa per CIGMA
TAG: Tolerància alterada a la glucosa
TNC: Tolerància normal a la glucosa per CIGMA
TTOG: Test de tolerància oral a la glucosa
UCP2: Proteïna desacopladora 2
VLDL: Lipoproteïnes de molt baixa densitat

ÍNDIX

Agraïments
Abreviatures

1	INTRODUCCIÓ.....	9
1.1	LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2: DEFINICIÓ	10
1.2	ABANS DE LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2	10
1.2.1	<i>La tolerància alterada a la glucosa i l'alteració de la glucosa basal</i>	11
1.2.2	<i>La síndrome metabòlica</i>	13
1.2.3	<i>Els familiars dels pacients diabètics</i>	16
1.3	FISIOPATOLOGIA DE LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2	18
1.3.1	<i>La secreció d'insulina</i>	18
1.3.2	<i>Acció insulínica</i>	21
1.3.3	<i>La resistència a la insulina</i>	22
1.3.4	<i>Resistència a la insulina i inflamació</i>	27
1.4	LA METFORMINA	34
1.4.1	<i>Mecanisme d'acció</i>	38
1.4.2	<i>Altres efectes metabòlics de la metformina</i>	41
1.4.3	<i>Efectes antiinflamatoris de la metformina</i>	42
1.5	ESTUDIS D'INTERVENCIÓ	43
1.5.1	<i>Modificacions de l'estil de vida</i>	43
1.5.2	<i>Intervencions farmacològiques</i>	44
2	HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	50
3	METODOLOGIA.....	53
3.1	PACIENTS I MÈTODES ESTUDI I: ELS FAMILIARS DELS PACIENTS DIABÈTICS TIPUS 2.....	54
3.1.1	<i>Pacients</i>	54
3.1.2	<i>Avaluació de la resistència a la insulina</i>	54
3.1.3	<i>Mesura de la secreció d'insulina</i>	55
3.1.4	<i>Avaluació de la secreció de proinsulina</i>	56
3.2	PACIENTS I MÈTODES ESTUDI II: ASSAIG DOBLE CEC DE METFORMINA FRONT A PLACEBO EN PACIENTS AMB TOLERÀNCIA ALTERADA A LA GLUCOSA.....	57
3.2.1	<i>Pacients</i>	57
3.2.2	<i>Mètodes analítics: Insulina i C-peptid</i>	59
3.2.3	<i>Determinació de les fraccions solubles dels receptors del TNF-α i la IL-18</i>	60
3.2.4	<i>Determinacions de la BPI i la LBP</i>	61
3.3	ANÀLISI ESTADÍSTICA	62
4	RESULTATS	63
4.1	RESULTATS ESTUDI I: ELS FAMILIARS DELS PACIENTS DIABÈTICS TIPUS 2	64
4.1.1	<i>Sensibilitat i secreció d'insulina</i>	64
4.1.2	<i>La secreció de proinsulina</i>	66
4.1.3	<i>La síndrome metabòlica en el grup de familiars</i>	66
4.2	RESULTATS ESTUDI II: ASSAIG DOBLE CEC DE METFORMINA FRONT A PLACEBO EN PACIENTS AMB TOLERÀNCIA ALTERADA A LA GLUCOSA.....	68
4.2.1	<i>Efectes metabòlics de la metformina</i>	68
4.2.2	<i>Efectes antiinflamatoris de la metformina</i>	69
4.3	TAULES	71
4.3.1	<i>Taula 1. Estudi I: Característiques clíniques dels familiars i controls</i>	71

4.3.2	<i>Taula 2. Estudi I: Diferències metabòliques entre els familiars amb tolerància alterada a la glucosa per CIGMA i els normoglicèmics.....</i>	72
4.3.3	<i>Taula 3. Estudi I: Característiques metabòliques dels familiars normoglicèmics i el controls estratificats en grups d'edat.</i>	73
4.3.4	<i>Taula 4. Estudi I: Secreció de proinsulina en els familiars i controls</i>	74
4.3.5	<i>Taula 5. Estudi I: Concentracions de proinsulina als familiars amb tolerància alterada a la glucosa per CIGMA respecte els normoglicèmics</i>	75
4.3.6	<i>Taula 6. Estudi I: Trets de la síndrome metabòlica dels familiars en relació al grau de sensibilitat a la insulina.....</i>	76
4.3.7	<i>Taula 7. Estudi II: Característiques clíniques i evolució dels pacients.....</i>	77
4.3.8	<i>Taula 8. Estudi II: Efectes de la metformina sobre la pressió arterial i el perfil lipídic</i>	78
4.3.9	<i>Taula 9. Estudi II: Efectes antiinflamatoris de la metformina</i>	79
5	DISCUSSIÓ.....	80
6	CONCLUSIONS.....	91
7	BIBLIOGRAFIA	94

1 INTRODUCCIÓ

1.1 La Diabetis Mellitus tipus 2: Definició

La diabetis mellitus compren a un grup heterogeni tant des del punt de vista etiològic com clínic, de trastorns hiperglucèmics. La diabetis mellitus tipus 2 és la més freqüent i afecta entre un 6 i un 10 % de la població europea. Es fruit d'una alteració de la sensibilitat i de la secreció d'insulina (Kahn SE, 2003).

La societat americana de diabetis (ADA) i l'organització mundial de la salut (OMS) van definir els criteris diagnòstics de la diabetis mellitus tipus 2 com aquella glucèmia en dejú superior o igual a 126 mg/dl o després d'un test de tolerància oral a la glucosa (TTOG) igual o superior a 200 mg/dl en dues ocasions que no requereix tractament insulínic d'inici per la supervivència de l'individu (ADA, 1997; WHO, 1999; ADA 2006).

La diabetis mellitus tipus 2 té una gran morbiditat i mortalitat i s'ha convertit en un problema de salut mundial en els països desenvolupats. És per això, que té una gran importància sanitària conèixer els mecanismes involucrats en la seva patogènia i els subjectes que estan a risc de desenvolupar-la per tal d'intentar evitar o retardar la seva aparició.

1.2 Abans de la diabetis mellitus tipus 2

Prèviament al diagnòstic clínic de la diabetis, han passat anys de diabetis no diagnosticada i d'alteracions de la tolerància a la glucosa que podria anomenar-se l'etapa de prediabetis. La prediabetis representaria aquell estat metabòlic entre la homeostasi normal a la glucosa i la hiperglucèmia diabètica. Inclou dues categories de pacients: la tolerància alterada a la glucosa (TAG) i l'alteració de la

glucèmia basal (AGB). La importància d'aquest període recau en que aquestes alteracions poden condicionar el desenvolupament d'una diabetis futura i al mateix temps es comporten com a factors de risc cardiovascular. A diferència de les complicacions microvasculars, típiques de la diabetis, les complicacions macrovasculars s'originen abans. En el moment del diagnòstic un 16 % dels pacients diabètics les presenten. Els subjectes amb TAG presenten freqüentment un patró aterogènic associat: obesitat, hipertensió arterial (HTA), hipertrigliceridèmia, colesterol HDL baix i microalbuminúria que afavorirà el desenvolupament d'aquestes complicacions (Haffner SM, i cols., 1990).

1.2.1 La tolerància alterada a la glucosa i l'alteració de la glucosa basal

La tolerància alterada a la glucosa (TAG) es defineix com aquella glucèmia a les dues hores després d'una sobrecàrrega oral de 75 g de glucosa entre 140 i 199 mg/dl. Aquests criteris definits per l'OMS al 1980, no es van modificar en les revisions posteriors dels criteris diagnòstics de la diabetis de l'ADA (ADA, 1997) i de l'OMS (WHO, 1999). L'alteració de la glucèmia basal (AGB) s'ha introduït en els darrers anys com una nova categoria d'alteració del metabolisme hidrocarbonat per tal de simplificar la identificació dels subjectes a risc sense haver de realitzar corbes de tolerància hidrocarbonada (The Decode study group, 2003). Inicialment es va definir com aquella glucèmia basal entre 110 i 125 mg/dl i posteriorment el dintell va baixar als 100 mg/dl (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003).

La prevalença d'alteracions hidrocarbonades no diabètiques en el nostre medi oscil·la entre un 13 % en homes a la quarta dècada de la vida fins a un 41 % en dones de més de 80 anys. Concretament la TAG augmenta amb l'edat (d'un 4 % a un 30 %) i és més freqüent en dones mentre que l'AGB clàssica és més estable en el temps, afectant entre un 4 i un 11 % de la població (Castell C, i cols., 1999; The Decode study group, 2003).

Aproximadament un 40 % dels subjectes amb tolerància alterada a la glucosa progressaran a diabetis al cap de 5 a 10 anys, la resta persistiran amb TAG o revertiran a normals (Zimmet P, i cols., 2001). La incidència anual de conversió varia entre un 1,5 % fins a un 6 - 7,3 % a poblacions amb alta prevalença de diabetis, com són els indis Pima, Nauru i americans d'origen mexicà i japonès (Lillioja S, 1996; Dowse GK, i cols., 1996).

Els factors que prediuen aquesta progressió han estat clàssicament en primer lloc la resistència a la insulina, l'hiperinsulinisme basal i l'obesitat, especialment la seva persistència en el temps i en segon lloc, la disminució de la secreció d'insulina i el grau d'hiperglucèmia basal i a les dues hores (Warram JH, i cols., 1996, Larsson H i Ahren B, 2000; Tirosch A, i cols., 2005). La reducció de la primera fase de secreció d'insulina i l'alteració dels polsos secretors es un factor crucial en aquelles poblacions on no hi ha una resistència a la insulina important (Polonsky KS, i cols., 1996, Pimenta W, i cols., 1996).

Paral·lelament a la resistència a la insulina diferents paràmetres inflamatoris han emergit darrerament com importants predictors de diabetis futura com són l'elevació de la proteïna C3 del complement (Engstrom G, i cols., 2005), el nombre de leucòcits circul·lants en sang perifèrica (Schmidt MI, i cols., 1999), la proteïna C reactiva (Barzilay JI, i cols., 2001; Festa A, i cols., 2002; Freeman

DJ, i cols., 2002; Han TS, i cols., 2002; Thorand B, i cols., 2003) i diferents citocines com la interleucina (IL) 6 (Duncan BB, i cols., 2003; Pradhan AD, i cols., 2001; Spranger J, i cols., 2003) i la interleucina 18 (Thorand B, i cols., 2005).

Els individus amb TAG presenten un risc cardiovascular més elevat respecte els subjectes normotolerants. El grau d'hiperglucèmia a les dues hores d'un TTOG i la insulinèmia basal s'han relacionat amb una major mortalitat per malaltia coronària (Haffner SM, i cols., 1990) i amb l'arteriosclerosi carotídea (Bonora E, i cols., 2000).

1.2.2 La síndrome metabòlica

La síndrome metabòlica compren un conjunt de factors de risc per la malaltia cardiovascular i la diabetis mellitus tipus 2. L'associació americana del programa nacional d'educació del colesterol (NCEP) va definir la síndrome metabòlica en el tercer pannel de tractament de l'adult (ATP III) quan en un mateix individu estaven presents tres o més dels cinc criteris següents (Executive summary of the third report of the NCEP 2002):

- a) Obesitat abdominal definida com la circumferència de la cintura a nivell de la part superior de la cresta ilíaca, superior a 88 cm a les dones i 102 cm als homes.
- b) Hiperglucèmia superior o igual a 110 mg/dl i inferior a 126 mg/dl
- c) Pressió arterial superior o igual a 130/80 mmHg
- d) Triglicèrids superiors o iguals a 150 mg/dl
- e) Colesterol-HDL inferior a 40 mg/dl en els homes i a 50 en les dones.

L'Organització Mundial de la Salut (WHO) defineix la síndrome metabòlica quan en un individu conflueixen tolerància alterada a la glucosa, diabetis mellitus, alteració de la glucèmia basal o resistència a la insulina més dos dels quatre criteris següents (WHO, 1999):

- Obesitat central definida com un índex cintura/maluc superior a 0,9 en els homes i superior a 0,85 en les dones
- HTA definida com pressió arterial superior o igual a 140/90
- Dislipèmia definida com a triglicèrids superiors o iguals a 150 mg/dl i/o HDL-colesterol inferior a 35 mg/dl en els homes i inferior a 39 mg/dl en les dones.
- Excreció urinària d'albumina superior a 30 mg/g de creatinina o a 30 mcg/min.

El Grup Europeu per l'estudi de la Resistència a la insulina (EGIR) ho defineix com: l'absència de diabetis més dos del quatre criteris següents (Balkau B, i cols., 1999):

- Circumferència de la cintura superior o igual a 94 cm en els homes i 80 cm en les dones.
- Triglicèrids superiors o iguals a 190 mg/dl o HDL colesterol inferior a 40 mg/dl
- HTA definida com pressió arterial superior o igual a 140/90
- Resistència a la insulina o concentracions d'insulina plasmàtica per sobre del quartell superior de la població no diabètica.

La prevalença de la síndrome metabòlica varia depenent dels criteris utilitzats i de la població estudiada. Augmenta amb l'edat i varia entre diferents ètnies. Així podem observar prevalences del 10 % en homes i del 7 % en dones a població francesa entre 30 i 64 anys (Balkau B, i cols., 2003) i del 43,6 % en homes i del 56,7 % en dones pertanyents a població nativa americana (Resnick HE, i cols., 2002).

L'estudi ARIC (estudi del risc arterioscleròtic a comunitats) va mostrar com la síndrome metabòlica era 4,7 vegades més freqüent en els subjectes que referien història familiar de diabetis tipus 2 respecte als controls (Liese AD, i cols., 1997). La disminució de l'activitat física, el tabac i l'alt contingut d'hidrats de carboni de la dieta també s'associen amb algun o tots els components d'aquesta síndrome (Park YW, i cols., 2003). També s'han descrit elevacions de la proteïna C reactiva i del nombre de leucòcits en sang perifèrica (Ford ES, 2003).

Les arrels d'aquesta agrupació de factors de risc estan lligades en part a la existència de resistència a la insulina, encara que ella mateixa no explicaria totes les manifestacions presents (Ferrannini E, 2006). És cert que la síndrome metabòlica comporta un risc relatiu de desenvolupar diabetis del 2,9, malaltia cardiovascular del 1,6 i de mortalitat del 1,2 (Ford ES, 2005); i que aquests subjectes són una població on caldria instaurar mesures terapèutiques per tal de prevenir totes aquestes manifestacions (Grundy SM, 2004). Recentment però l'associació americana i europea de diabetis han qüestionat el fet de classificar els individus en portadors o no de la síndrome metabòlica i recomanen a la pràctica clínica tractar tots els factors de risc cardiovascular de forma independent, s'agrupin o no de manera sindròmica (Kahn R, i cols., 2005 a; Kahn R, i cols., 2005 b).

1.2.3 Els familiars dels pacients diabètics

Els familiars de primer grau dels pacients diabètics tipus 2 presenten un risc de desenvolupar la malaltia entre dos i quatre vegades per sobre la població general. La diabetis mellitus tipus 2 té una forta agregació familiar; així un 38 % dels germans i un 33 % dels fills d'un pacient diabètic desenvoluparan la diabetis. A més a més, la concordància entre bessons monozigòtics és alta, al voltant del 70-90 % (Hamman RF, 1992). És per això que els familiars de primer grau constitueixen un grup ideal on estudiar els defectes metabòlics inicials i on plantejar instaurar mesures preventives.

Diferents estudis han mostrat com aquests individus manifesten defectes a la sensibilitat i a la secreció d'insulina. Mitjançant tests específics es detecta una resistència a la insulina superior a la dels individus control (Eriksson J, i cols., 1989; Gulli G, i cols., 1992; Haffner SM, i cols., 1988; Johnston C, i cols., 1990; Laws A, i cols., 1989; Leslie RDG, i cols., 1986; Lillioja S, i cols., 1993; Martin BC, i cols., 1992; Osei K, i cols., 1991; Warram JH, i cols., 1996) així com també anomalies de la secreció pulsàtil d'insulina (O' Rahilly SP, i cols., 1986; O' Rahilly S, i cols., 1988, Pimenta W, i cols., 1996). La importància d'un o altre defecte variarà entre individus, paral·lelament a la heterogeneïtat clínica de la mateixa diabetis mellitus tipus 2 (Lillioja S, i cols., 1993). Així en alguns subjectes predominarà el dèficit sensitiu (Lillioja S, 1996) i en d'altres el secretor compartint trets comuns amb la diabetis mellitus tipus MODY (Chen KW, i cols., 1995; Mahtani MM, i cols., 1996; Turner RC, i cols., 1988). La resistència a la insulina trobada a fills de pacients diabètics tipus 2 s'ha relacionat amb anomalies

de la fosforilació oxidativa mitocondrial (Petersen KF, i cols., 2004) i de la síntesis de glucògen (Eriksson J, I cols., 1989).

1.3 Fisiopatologia de la Diabetis Mellitus Tipus 2

La diabetis mellitus és una malaltia complexa de causa no coneguda on si combinen defectes variables de la secreció i de la resistència a la insulina. Com a conseqüència d'aquesta interacció i depenent del grau d'afectació d'aquests processos es desenvoluparà o no la malaltia (DeFronzo RA, 1992).

1.3.1 La secreció d'insulina

La disfunció de la cèl·lula beta es necessària per l'aparició de la diabetis mellitus tipus 2. Si existeix resistència a la insulina i la cèl·lula beta es capaç de compensar, tindrem hiperinsulinèmia però no hiperglucèmia. Aquesta apareixerà quan la capacitat secretora de la cèl·lula beta sigui insuficient, llavors estarem davant d'una hipoinsulinèmia relativa.

a) En condicions normals:

La insulina es sintetitzada a les cèl·lules beta de l'illot pancreàtic inicialment com un precursor, la preproinsulina, que es transformarà en proinsulina. Aquesta es emmagatzemada en vesícules i posteriorment gràcies a l'endopeptidasa tipus 1 i 2 es converteix en els metabolits 32,33 proinsulina i 65,66 proinsulina respectivament. Després per l'acció de carboxipeptidases passen a ser els metabolits des-proinsulina 31,32 i des-proinsulina 64,65. Finalment les endopeptidases tipus 2 i tipus 1 els convertiran en insulina i C-pèptid.

La glucosa entra a la cèl·lula β a través del transportador de glucosa (GLUT) 2 de baixa especificitat i es metabolitza per la glucocinasa que actua com un veritable censor de la glucèmia. Posteriorment seguint la via de la glucòlisi i la cadena respiratòria mitocondrial es produeix adenosín trifosfat (ATP) que tanca els canals de K^+ . Aquest fet desporalitza la membrana, obrint-se a continuació els canals de Ca^{2+} i es produeix l'exocitosi i l'alliberament dels grànuls d'insulina.

b) Alteracions a la diabetis:

La causa de la disfunció cel·lular beta en els pacients diabètics tipus 2 no és coneguda. En primer lloc se sap que tenen una resposta anòmala a l'estímul de glucosa. La secreció d'insulina és inferior en els primers 30 minuts d'un TTOG i tot i que s'eleva a la segona hora en comparació als subjectes controls, és insuficient per compensar la resistència a la insulina concomitant. La hiperglucèmia tardana del TTOG està en part relacionada amb la ineficient supressió de la producció hepàtica de glucosa (Mitrakou A, i cols., 1992).

Els subjectes normotolerants secreten la insulina de manera pulsàtil, amb una periodicitat entre 10 i 13 minuts i està en relació a oscil·lacions de la glucosa plasmàtica. El pacient diabètic, en canvi, té abolida la pulsatilitat. A més a més, la primera fase de secreció que compren els primers 8 minuts és inexistent i la segona fase està disminuïda. La pèrdua de la pulsatilitat contribueix a malmetre la supressió hepàtica de glucosa (Bratusch-Marrain PR, i cols., 1986).

En segon lloc, estudis de necròpies de pacients diabètics han trobat disminucions d'un 50 % de la massa cel·lular beta. Encara que es pensa que per aparèixer la diabetis no seria suficient i s'hauria d'acompanyar de disfunció dels

illots restants ja que no sempre les pancreatectomies parcials provoquen diabetis (Weir GC i Bonner-Weir S, 2003). També s'han detectat dipòsits d'amiloide a nivell de l'illot i tot i que no es coneix en claredat la seva funció, es pensa que podrien exercir un efecte tòxic cel·lular (Lorenzo A, i cols., 1994).

En tercer lloc, en els pacients diabètics existeix un augment de la secreció de proinsulina (Saad MF, i cols., 1990; Ward WK, i cols., 1987). Aquesta proinsulina s'havia suggerit que podia ser la manifestació d'un defecte en el processament de la insulina. Alguns autors creien que podria comportar-se com un marcador de diabetis futura ja que s'havia trobat elevada en grups de pacients amb TAG (Davies MJ, i cols., 1993; Kahn SE, i cols., 1995). Aquest fet no ha estat corroborat per altres estudis, sent bastant infreqüent a fases prediabètiques. Probablement l'augment de secreció de proinsulina no és més que el resultat de l'augment de les demandes secretores d'insulina que ferien depleccionar els grànuls immadurs, mostrant una relativa insuficiència de l'acció de les carboxipeptidases (Birkeland KI, i cols., 1994; Pflutzner A, i cols., 2004).

En quart lloc la secreció d'insulina pot estar malmesa per l'efecte tòxic de la hiperglucèmia, fenomen que es coneix com a glucotoxicitat. La cèl·lula beta disminueix la seva capacitat de resposta davant nivells alts i mantinguts de glucosa. La transcripció del gen d'insulina i la d'altres factors de transcripció que són claus pel funcionament de l'illot està disminuïda (Olson LK, i cols., 1993). La hiperglucèmia crònica també pot induir la mort cel·lular per apoptosi (Biarnés M, i cols., 2002).

Els àcids grassos lliures (AGL) estimulen la secreció d'insulina però, en excés la influencien negativament, fenòmen que es coneix com a lipotoxicitat. En models animals s'ha descrit la proteïna desacopladora 2 (UCP2) que exerciria un efecte negatiu sobre la secreció d'insulina al disminuir la producció d'ATP de la cadena respiratòria mitocondrial (Langin D, 2001). La síntesi d'aquesta proteïna podria estar induïda pels AGL, el que explicaria el lligam existent entre obesitat, disfunció cel·lular beta i diabetis mellitus (Zhang CY, i cols., 2001).

Per últim, cal ressenyar també el paper que puguin jugar les incretines com el pèptid 1 similar al glucagó (GLP-1) en la disfunció cel·lular beta de la diabetis mellitus tipus 2. Aquestes substàncies que s'alliberen quan la glucosa oral i altres nutrients arriben al budell i que potencien la síntesi d'insulina induïda per la glucosa, estan disminuïdes a la diabetis mellitus tipus 2. A part dels seus efectes insulíntròpics, el GLP-1 exerceix efectes tròfics sobre l'illot, estimula la seva replicació i diferenciació i disminueix l'apoptosi cel·lular beta. També inhibeix la secreció de glucagó, enlenteix el buidament gàstric i causa sacietat (Leon DD, i cols., 2006).

1.3.2 Acció insulínica

La insulina inicia les seves accions biològiques complexes unint-se al domini extracel·lular d'una glucoproteïna transmembrana que és el receptor d'insulina. Aquest consta de dos subunitats alfa totalment extracel·lulars, on s'uneix el lligand i dos subunitats beta que inclouen la porció transmembrana i el domini intern amb propietats tirosín cinasa. Les diverses subunitats es mantenen unides a través d'enllaços disulfurs. Quan la insulina s'uneix al domini

extracel·lular es produeix un canvi conformacional en el domini intracel·lular de manera que el receptor s'autofosforila i pot unir-se al trifosfat d'adenosina (ATP) (Olefsky JM, 1990). Els residus tirosina activats fosforilen a les proteïnes substrat del receptor d'insulina (IRS). Es coneixen quatre membres de la família: el IRS-1, el IRS-2, el IRS-3 i el IRS-4. El IRS-1 és la forma predominant al múscul i al teixit adipós, el IRS-2 al fetge i a la cèl·lula beta, el IRS-3 s'expressa al teixit adipós, als fibroblastes i al fetge de ratolins, encara que no s'ha detectat en humans, mentre que el IRS-4 s'ha detectat al cervell, timus i a les cèl·lules embrionàries renals. Les molècules IRS s'uneixen a la seva vegada amb dominis SH2 de diferents proteïnes de senyalització entrant en una cascada d'activació de diferents enzims que culmina amb les accions anabòliques de la insulina. En primer lloc es fosforila la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI 3-cinasa) que activa a la proteïna cinasa C (PKC) que estimula el transport de glucosa; la proteïna cinasa B (PKB/akt) que promou la síntesi de glucògen i la proteïna de mamífers d'unió a la rapamicina (mTOR); que indueix la síntesi proteica. En segon lloc, altres proteïnes amb dominis SH2 són fosforilades per les molècules IRS com la proteïna d'unió 2 del receptor del factor de creixement (Grb2) que servirà de pont a la via d'activació de les proteïnes activades per mitògens (MAP), les quals juguen un paper fonamental en la generació de factors de transcripció que intervenen en la diferenciació i el creixement cel·lular (White MF, 2002).

1.3.3 La resistència a la insulina

La resistència a la insulina es defineix com la disminució de la capacitat de la insulina per exercir les seves accions biològiques en els teixits perifèrics diana. Constitueix la base patològica comuna de nombroses malalties metabòliques com:

la diabetis mellitus tipus 2, la hipertensió arterial, l'obesitat, la síndrome de l'ovari poliústic, l'esteatosi hepàtica no alcohòlica i la malaltia cardiovascular.

a) Factors ambientals associats:

La sensibilitat a la insulina està sota la influència de factors ambientals i genètics. Entre els primers cal destacar: l'edat, l'exercici físic, l'obesitat i l'ambient intrauterí. L'edat clàssicament s'ha associat a un increment de la resistència a la insulina en relació probablement als canvis de composició corporal, ja que es produeix un augment del greix corporal en detriment de la massa muscular (DeFronzo RA, 1979). L'exercici tant la forma aguda com crònica millora la sensibilitat a la insulina degut a un augment de la síntesi de glucògen derivada del consum i a un augment del nombre i activitat dels GLUT-4 (Prigeon RL, i cols., 1995).

L'obesitat és una condició que s'associa freqüentment a la resistència a la insulina. Probablement la seva existència està condicionada no sols per determinants d'estil de vida com és el sedentarisme i el consum excessiu de greixos i hidrats de carboni ràpids sinó que també existirà una base genètica predisposant encara que no coneguda del tot. L'obesitat perllongada en el temps (Modan M, i cols., 1986), l'augment de la mida dels adipòcits i el conseqüent increment plasmàtic dels AGL són factors de risc pel desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 2 (Paolisso G, i cols., 1995).

L'ambient intrauterí pot també contribuir al desenvolupament de resistència a la insulina. Diferents factors metabòlics i hormonals de la mare, la

seva dieta, el seu grau de resistència a la insulina o bé disfuncions o hipòxies placentàries poden condicionar un retard intrauterí del fetus. Per la teoria del “thrifty fenotip” o fenotip estalviador la desnutrició intrauterina és crítica. Aquests nadons neixen amb un baix pes per l’edat gestacional i probablement se’ls hi ha induït una resistència a la insulina per poder aprofitar millor els nutrients en els òrgans fonamentals com són el cervell i el sistema immune, no depenents d’insulina. Al mateix temps la capacitat de la cèl·lula beta pot estar minvada davant una desnutrició. Posteriorment al naixement, fan una recuperació ràpida del pes i a l’edat adulta tindran més risc de desenvolupar HTA, TAG, diabetis mellitus tipus 2 o bé la síndrome de l’ovari poliquístic (Eriksson JG, i cols., 2002; Ibáñez L, i cols., 2001).

b) Factors genètics associats:

La sensibilitat a la insulina són també el resultat d’una base genètica complexa i no del tot coneguda. Diferents polimorfismes genètics de la part codificant o reguladora de diferents gens com la calpaïna 10 (Ridderstrale M, i cols., 2005), la glucògen sintetasa (Groop LC, i cols., 1993; Vionnet N i Bell GI, 1993; Kuroyama H, i cols., 1994; Vaag A, i cols., 1992), el canal de potassi dependent d’ATP a nivell de la cèl·lula beta (Koster JC, i cols., 2005) i el IRS-1 (Hitman GA, i cols., 1995) s’han associat en estudis casos control a la diabetis mellitus tipus 2. La calpaïna 10, per exemple, és el primer gen relacionat amb la diabetis mellitus tipus 2 a través d’estudis genòmics d’associació a gran escala i que posteriorment s’ha investigat la seva funció. Sembla que aquesta proteïna facilita la translocació dels GLUT 4 i que també és una molècula important a la cèl·lula beta ja que participa en l’exocitosi de la insulina (Turner MD, i cols.,

2005). S'han descrit també mutacions dominants negatives del receptor γ de l'activador de la proliferació dels peroxisomes (PPAR- γ) que explicarien menys del 4 % dels casos de resistència a la insulina (Barroso I, i cols., 1999). El bloqueig de l'IRS-1 en animals d'experimentació produeix retard de creixement però no diabetis; en canvi l'alteració del funcionament del IRS-2 empitjora la sensibilitat a la insulina i la secreció beta pancreàtica i es causa de diabetis (Withers DJ, i cols., 1998). Un altre dels gens estudiats és el del receptor β -3-adrenèrgic, el qual regula la lipolisi en el greix visceral i augmenta la termogènesi. Mutacions en aquest gen s'han associat a l'obesitat i a l'aparició precoç de la diabetis mellitus tipus 2 (Walston J, i cols., 1995; Widen E, i cols., 1995).

c) Resistència a la insulina en els diferents teixits:

Els teixits clau on la insulina actua són el fetge, el teixit adipós i el múscul. A nivell del fetge la resistència a la insulina es manifesta amb un augment de la producció hepàtica de glucosa al no bloquejar la insulina la neoglucogènesi durant els períodes postabsortius (Gerich JE, 1991). En el fetge existeix una acumulació de greix fruit de l'augment de la lipòlisi, la captació d'AGL i l'augment en la síntesi de triglicèrids. Tots aquests fenòmens contribueixen a l'aparició d'una inflamació hepatocel·lular subaguda, l'esteatohepatitis, que comportarà una elevació de citocines proinflamàtores que provoquen resistència a la insulina local i sistèmica (Cai D, i cols., 2005). Aquesta entitat pot progressar a fibrosis hepàtica i cirrosi (Bugianesi E, i cols., 2004). El més comú a les fases inicials és l'elevació asimptomàtica dels enzims: alanina aminotransferasa (ALT), aspartat aminotransferasa (AST) i en menor grau la γ -glutamilttransferasa (GGT) i la fosfatasa alcalina (FA). Existeix una interrelació entre l'elevació dels enzims

hepàtics i la resistència a la insulina. Diferents estudis prospectius mostren com els increments de l'ALT, l'AST (Hanley AJ, i cols., 2004; Ohlson LO, i cols., 1988; Sattar N, i cols., 2004; Vozarova B, i cols., 2002) i la GGT (Perry IJ, i cols., 1998) prediuen el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 2.

El teixit adipós, considerat clàssicament com un orga de reserva energètica té un paper actiu i influent en el grau de sensibilitat a la insulina de l'individu. El 80 % es localitza en el teixit subcutani i al voltant d'un 10 % a nivell visceral; la resta en altres localitzacions com la zona perirenal i peritoneal. Concretament el teixit adipós visceral té una capacitat lipolítica superior respecte al seu homòleg subcutani. Situacions que incrementin la lipolisi provocaran un excés en l'alliberació d'AGL, que un cop al fetge seran substrats per la neoglucogènesis hepàtica. A nivell muscular, l'augment d'AGL provoca una acumulació intracel·lular de diacilglicerol el qual és un important activador de la proteïna cinasa C (PKC). La PKC és un enzim que pot fosforilar residus serina i treonina del receptor d'insulina i del IRS-1, disminuint la seva activitat i ocasionant resistència a la insulina. L'augment del diacilglicerol s'acompanya també de l'activació de la via proinflamatòria del factor nuclear KB (NF-KB) relacionada amb la inducció de proteïnes proaterogèniques (DeFronzo RA, 2004; Ross R, 1999).

La resistència a la captació muscular de la glucosa mitjançada per la insulina es característica dels pacients diabètics tipus 2, intolerants a la glucosa i també en els seus familiars. A part de la lipotoxicitat provocada pels AGL, s'han descrit també defectes a la via no oxidativa de la glucosa (Håring HU i Mehnert H, 1993), fonamentalment disminucions de l'activitat de l'enzim glucògen

sintetasa (Eriksson J, i cols., 1989; Vaag A, i cols., 1992; Vestergaard H, i cols., 1993).

1.3.4 Resistència a la insulina i inflamació

En els últims anys s'ha relacionat la síndrome metabòlica i l'arteriosclerosi amb la inflamació (Ross R, 1999; Libby P, 2003). La diabetis mellitus tipus 2 seria la manifestació d'un estat subclínic d'inflamació crònica (Pickup JC i Crook MA, 1998). Els subjectes amb resistència a la insulina i amb alteracions hidrocarbonades presenten augments de diferents paràmetres inflamatoris com són la proteïna C- reactiva, el recompte leucocitari (Nakanishi N, i cols., 2002) i interleucines suggerint que les bases moleculars dels dos fenòmens són comunes o comparteixen en algun punt les mateixes vies metabòliques (Fernández-Real JM i Ricart W, 2003; Ridker PM i cols., 2003; Festa A, i cols., 2000). Així elevacions de la proteïna C3 del complement (Engstrom G, i cols., 2005), el nombre de leucòcits (Schmidt MI, i cols., 1999) i la proteïna C reactiva (Barzilay JI, i cols., 2001; Festa A, i cols., 2002; Freeman DJ, i cols., 2002; Han TS, i cols., 2002; Thorand B, i cols., 2003) són factors predictors del desenvolupament de diabetis mellitus tipus 2.

Per altra banda, malalties cròniques inflamatòries com l'artritis reumatoide i l'hepatitis augmenten de forma significativa el risc de desenvolupar resistència a la insulina i/o diabetis mellitus tipus 2, fet que corrobora el lligam existent entre els estats d'inflamació crònica i l'alteració de l'acció insulínica (Knobler H, i cols., 2003; Sattar N, i cols., 2003).

Els subjectes resistents a la insulina tenen una resposta immune inadequada als agents externs davant una infecció o un determinat patró alimentari. Sabem que la resistència a la insulina és molt prevalent a la població general i accentuada en determinades ètnies d'indis americans i nauru. Per la teoria del gen estalviador (thrifty genotype) un genotip proinflamatori resistent a la insulina ha perdurat al llarg de generacions i ha permès la supervivència d'importants grups poblacionals davant condicions ambientals adverses. Aquests individus han suportat èpoques de dejuni i de manca d'aliment i han lluitat amb efectivitat davant les infeccions. Aquesta base genètica els hi conferia una avantatge evolutiva i per aquest motiu actualment són gens tan prevalents. Quan les condicions ambientals canvien el que abans era una avantatge es converteix en problema i el consum mantingut d'aliments amb alt contingut calòric ocasiona obesitat. El perfil proinflamatori arriba a ser advers i empitjora la resistència a la insulina per un cercle viciós, conduint tot aquest fenotip a la diabetis mellitus tipus 2 i la malaltia cardiovascular (Fernández-Real JM i Ricart W, 1999; Pickup JC i Crook MA, 1998).

a) Les citocines:

Les citocines són molècules peptídiques sintetitzades principalment per cèl·lules immunes: limfòcits, monòcits i macròfags per fer front a una noxa externa, interna o reacció inflamatòria. L'adipòcit, la cèl·lula endotelial, el fibroblaste i les cèl·lules del múscle llis també tenen aquesta capacitat. El teixit adipós, sobretot el visceral, expressarà citocines que modularan l'acció insulínica i induiran un estat proinflamatori. Dintre de les citocines produïdes en el teixit adipós tenim la leptina, l'inhibidor 1 de l'activador del plasminògen (PAI-1), la

interleucina 6, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), l'adiponectina, amb propietats sensibilitzadores de la insulina (Kershaw EE i Flier JS, 2004), la resistina (Steppan CM, i cols., 2001) i la visfatina, aquesta última amb acció similar a la insulina en estudis in vitro (Fukuhara A, i cols., 2005).

El TNF- α és una de les principals adipocitocines sintetitzada bàsicament en el teixit adipós i muscular. Promou la resistència a la insulina per la seva capacitat de fosforilar la serina del IRS-1, disminuint la seva activitat fosforilant. El TNF- α s'uneix a dos receptors, el TNFR1 i el TNFR2. Cada receptor s'expressa de manera independentment a la majoria de les cèl·lules. Després d'unir-se al seu receptor es produeix la separació del component extracel·lular que n'és la forma soluble i que s'anomena la fracció soluble del receptor 1 del TNF- α (sTNFR1) de 55 kDa i la fracció soluble del receptor 2 del TNF- α (sTNFR2) de 75 kDa (Aderka D, i cols., 1992 a; Nophar Y, i cols., 1990). La determinació del TNF- α no dona informació precisa sobre la seva acció. Per contra els sTNFRs són proteïnes més estables, que tenen un temps de vida mitja més alt i que són indicadors més sensibles de l'acció del TNF- α . Així a pacients amb sepsis s'han trobat elevacions circulants dels sTNFRs mentre que el TNF- α era indetectable (Schroder J, i cols., 1995). Les concentracions dels sTNFR a individus sans són bastant estables al llarg del temps (Aderka D, i cols., 1992b). La sTNFR2 està associada a la resistència a la insulina en pacients no diabètics (Fernández-Real JM, i cols., 1998; Straczkowski M, i cols., 1998). L'exercici regular a dones obeses i a pacients diabètics provoca una milloria de la sensibilitat a la insulina en paral·lel a una disminució de les concentracions circulants de sTNFR2 (Fernández-Real JM, i cols., 2002; Tsukui S, i cols., 2000). El TNF- α alliberat en

excés en subjectes obesos seria una de les causes de resistència a la insulina observada a l'obesitat, la qual no deixa de ser un espectre més d'un estat inflamatori. Així models de ratolí deficientes amb $\text{TNF-}\alpha$ no presenten obesitat malgrat la seva inducció per la dieta (Uysal KT, i cols., 1997). L'acció inductora de resistència a la insulina la realitza gràcies a l'activació de tot un seguit de proteïnes cinases com són les amino terminals c-Jun (JNK), la cinasa inhibidora del factor nuclear κB (IKK) i la proteïna cinasa C (PKC) (DeFronzo RA, 2004; Hirosumi J, i cols., 2002; Hotamisligil GS, 2005) (Fig. 1).

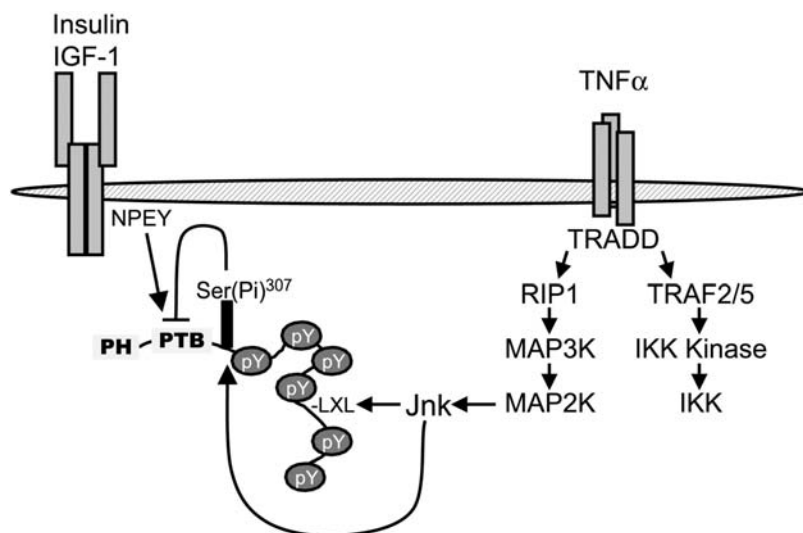


Figura 1: El $\text{TNF-}\alpha$ a través de les cinases JNK inhibiria l'acció insulínica. JNK: cinases amino terminals c-Jun, IKK: cinasa de l'inhibidor de les cadenes lleugeres kappa, RIP1: proteïna d'interacció amb el receptor 1, TRAF2/5: Factors associats amb el receptor TNF, MAPK: proteïna cinasa activada per mitògens. PH-PTB: dominis de les proteïnes IRS. Adaptat de White MF, 2002.

La interleucina (IL) 6 és una citocina sintetitzada en els adipòcits, miòcits, cèl·lules del sistema immune, fibroblastes i cèl·lules endotelials. Concentracions elevades d'IL-6 es relacionen amb la resistència a la insulina (Fernández-Real JM,

i cols., 2001) i prediuen el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 2 (Duncan BB, i cols., 2003; Pradhan AD, i cols., 2001; Spranger J, i cols., 2003).

La interleucina 18 coneguda prèviament com a factor inductor de l'interferon γ és una citocina proinflamatòria que s'expressa en diferents teixits en el context de diferents malalties infeccioses, càncers i inflamació crònica (Gracie JA, i cols., 2003). El seu receptor es troba a nivell de macròfags, neutròfils, cèl·lules natural killer, cèl·lules endotelials, del múscle llis, cèl·lules de Kupffer (Gerdes N, i cols., 2002) i ha estat induïda la seva expressió a l'hepatitis B (Lee MO, i cols., 2002). Concentracions elevades d'interleucina 18 estan lligades a la resistència a la insulina (Bosch M, i cols., 2005), són més elevades en pacients diabètics tipus 2 (Esposito K, i cols., 2003a) i disminueixen després de la pèrdua de pes (Esposito K, i cols., 2003b). L'IL-18 se l'ha relacionat com a possible inductora de la malaltia hepàtica associada a la resistència a la insulina (López-Bermejo A, i cols., 2005) i la seva elevació prediu el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 2 (Thorand B, i cols., 2005).

La resistina és una altra molècula secretada pel teixit adipós de ratolins genèticament obesos o amb obesitat induïda a través de la dieta. Quan es bloqueja la seva acció a través d'un anticòs millora la glucèmia, la sensibilitat a la insulina i la captació de glucosa al adipòcit. Al mateix temps el tractament de ratolins amb resistina recombinant origina tolerància alterada a la glucosa i resistència a la insulina. És doncs, una molècula involucrada en la relació obesitat i diabetis mellitus tipus 2 (Steppan CM, i cols., 2001).

Pel contrari l'adiponectina anomenada també proteïna relacionada amb el complement de 30 KDa (Acpr30) és una adipocitocina que es relaciona amb una major sensibilitat a la insulina (Weyer C, i cols, 2001). Concentracions baixes d'adiponectina estan associades a la diabetis mellitus tipus 2 i a la resistència a la insulina (Lindsay RS, i cols., 2002). El tractament amb glitazones augmenta les seves concentracions (Maeda N, i cols., 2001) i el seu bloqueig en animals d'experimentació induïx un estat de resistència a la insulina amb augment del TNF- α i una disminució de l'oxidació lipídica en el múscle (Maeda N, i cols., 2002).

b) Altres molècules amb capacitat antiinflamatòria:

Cada vegada més es van esbrinant altres components del sistema innat immune relacionats amb la resistència a la insulina. El sistema innat immune és la primera línia de defensa davant agents externs com les infeccions microbianes i les lesions físiques o químiques. Un exemple el tenim amb el receptor soluble CD14 del monòcits amb propietats antiinflamatòries i al mateix temps sensibilitzadores de l'acció insulínica. Aquest s'associa de manera inversa a alteracions del metabolisme de la glucosa i la resistència a la insulina (Fernández-Real JM, i cols., 2003).

Per altra banda els mateixos polimorfonuclears tenen també la capacitat de sintetitzar proteïnes que actuen com a veritables antibiòtics endògens i juguen un paper defensiu en front dels agents infecciosos. La proteïna bactericida incrementadora de la permeabilitat (BPI) té un pes molecular de 55 kDa i es troba fonamentalment als grànuls dels neutròfils i en menor quantitat en els eosinòfils i a les cèl·lules epitelials de pell i mucoses (Weiss J i Olsson I., 1987). La seva capacitat citotòxica va dirigida fonamentalment contra les bacteries gram

negatives degut a la seva alta afinitat pels lipopolisacàrids bacterians (LPS). L'estructura cristal·lina de la BPI inclou una part N- terminal que posseeix activitat neutralitzadora i antibacteriana i una part C- terminal amb activitat opsònica (Beamer LJ, i cols., 1997).

Com a competidora de la BPI tenim a la proteïna plasmàtica fixadora del LPS (LBP), la qual es sintetitza al fetge i s'encarrega de presentar el LPS al receptor CD14, MD2 i TLR-4 dels monòcits (Fenton MJ i Golenbock DT, 1998; Ulevitch RJ i Tobias PS, 1999). La unió LBP-LPS activa als macròfags, a diferència de la BPI que exhibeix una acció més antiinflamatòria (Elsbach P, 1998; Levy O, i cols., 2003; Weiss J, 2003). Així mateix, l'afinitat de la BPI per la LPS és molt superior a la que presenta la LBP (Elsbach P, 1998).

1.4 La Metformina

La metformina es una dimetilbiguanida que està estructuralment relacionada amb la guanidina que és la substància activa de la lila francesa (*Galega officinalis*), un remei tradicional durant l'època medieval a Europa per la diabetis (Fig. 2). Va ser utilitzada per primer cop a la pràctica clínica al 1957 pel tractament de la diabetis mellitus tipus 2. Els seus efectes antihiperglucèmians són deguts al seu efecte a nivell dels teixits perifèrics: el fetge, el múscle i el teixit adipós. No augmenta la secreció d'insulina i per tant no es causa d'hipoglucèmies (Bayley CJ, i cols., 1996). Té una biodisponibilitat del 50-60 %. No s'han identificat metabolits i s'excreta per via renal. El seu temps de vida mitja és entre 4 i 8,7 hores (Dunn CJ i Peters DJ, 1995).

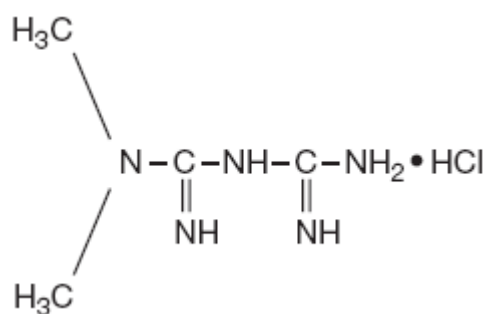


Figura 2: Estructura química de la metformina (dimetilbiguanida). Adaptat de Dunn CJ i Peters DH, 1995.

Entre els seus efectes indesitjables destaquen els gastrointestinals fonamentalment les diarrees, que poden aparèixer en un 30 % dels casos.

Aproximadament entre un 10 i un 30 % dels malalts tractats amb metformina presenten disminució de l'absorció de la vitamina B12 que és reversible al donar suplementes de calç. La metformina competeix amb el calç a nivell del receptor ileal d'aquesta vitamina (Bauman WA, i cols., 2000). Independentment de la reducció de la hiperglucèmia la metformina és dels pocs hipoglucèmians orals que ha demostrat una disminució dels esdeveniments cardiovasculars (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998).

a) Acció en el fetge

Els efectes hepàtics constitueixen la seva acció fonamental. La metformina disminueix la producció de glucosa gràcies a la inhibició de la neoglucogènesi, la qual està augmentada dues i tres vegades més en els pacients diabètics que en els controls (Stumvoll M, i cols., 1995). Inhibeix l'activitat de la glucosa-6- fosfatasa afavorint el manteniment de les reserves de glucògen (Mithieux G, i cols., 2002).

En segon terme també disminueix la glucogenolisis (Cusi K, i cols., 1996) i augmenta la captació hepàtica de glucosa mitjançada per insulina (Iozzo P, i cols., 2003). El tractament amb metformina aconsegueix minvar la glucosa en dejú entre un 25 a un 30 % (Hundal RS, i cols., 2000).

Estudis in vitro mostren com la metformina disminueix la captació de lactat i les concentracions intracel·lulars d'ATP, el qual és un inhibidor de la piruvatcinasa. La metformina afavoreix la conversió de piruvat a lactat i disminueix l'activitat de la fosfoenolpiruvat-carboxicinasa. Potencia la inhibició que realitza la insulina de la neoglucogènesi hepàtica a partir de lactat, piruvat, glicerol i diferents aminoàcids (Hundal RS i Inzucchi SE, 2003; Wiernsperger NF i Bailey CJ, 1999). Disminueix la síntesi hepàtica de triglicèrids, la lipòlisi, i la

captació hepàtica d'AGL contribuint a una menor producció de glucosa al disminuir la font principal de la neoglucogènesis (Perriello G, i cols., 1994). Part d'aquestes accions explicarien els efectes beneficiosos potencials de la metformina sobre l'esteatosi hepàtica no alcohòlica (Marchesini G, i cols., 2001) (Fig. 3).

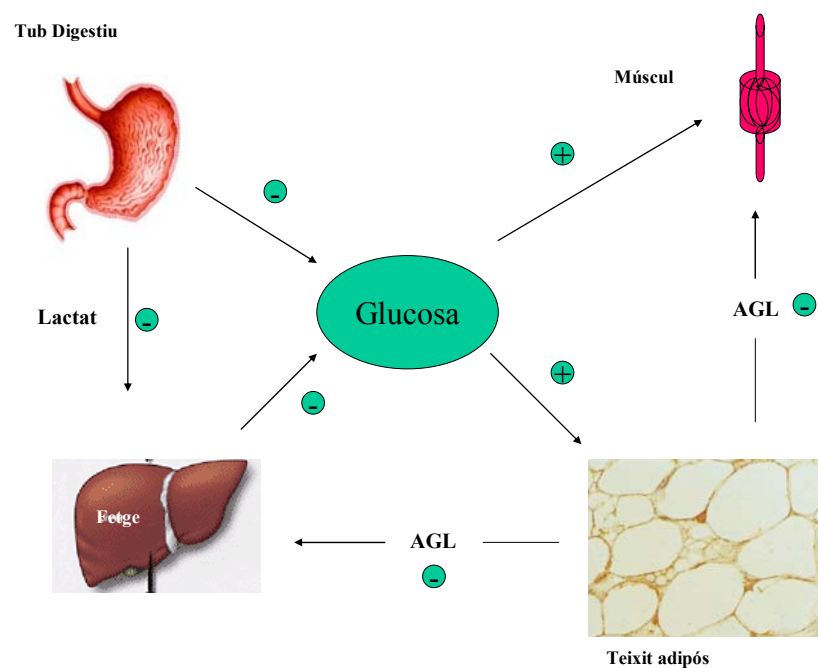


Figura 3: Representació esquemàtica de les accions metabòliques de la metformina en els diferents teixits. Adaptat de Giannarelli R, i cols., 2003. AGL: Àcids grassos lliures.

b) Acció en el múscul

En estudis casos - control la metformina augmenta la captació de glucosa mitjançada per la insulina a nivell del múscul entre un 20 a un 30 % (Bayley CJ, i cols., 1996). Incrementa l'activitat i el reclutament dels GLUT 4 i en general el metabolisme no oxidatiu de la glucosa (Widen E, i cols., 1992). En estudis in vitro

i en animals d'experimentació la metformina millora la activitat tirosinasa del receptor insulínic i augmenta la síntesis de glucògen (Domínguez LJ, i cols., 1996; Rossetti L, i cols.,1990).

Un excés d'AGL procedents del teixit adipós pot inhibir la piruvat deshidrogenasa i l'activitat de la piruvat cinasa PI3 associada a l'IRS-1, el que comporta un disminució de la utilització de glucosa. La metformina millora indirectament la oxidació de la glucosa al disminuir la concentració d'AGL circulants, pel cicle de Randle (Giannarelli R, i cols., 2003).

c) Acció en el teixit adipós

La metformina redueix en un 17 % les concentracions circulants d'AGL i l'oxidació lipídica en un 25 % (Abbasi F, i cols., 1998). Afavoreix l'esterificació dels AGL. Estudis en adipòcits in vitro mostren com la metformina reverteix els defectes a la endocitosi dels GLUT-4 que apareixen en situacions d'hiperinsulinisme crònic, augmentant la captació de glucosa (Pryor PR, i cols., 2000).

d) Cèl·lula beta i metformina

La metformina, indirectament al reduir les concentracions de glucosa i AGL circulants millora la glucotoxicitat i la lipotoxicitat sobre la cèl·lula beta pancreàtica. Així estudis in vitro mostren una recuperació de les anomalies secretores de l'illot que ha estat exposat a concentracions elevades de glucosa i AGL contribuint a la preservació de la seva funció (Patanè G, i cols., 2000). L'acció directa de la metformina sobre la cèl·lula beta era fins ara desconeguda. Recentment s'ha vist que podria tenir un paper en la regulació de l'expressió de

determinats gens, com el factor 1 promotor de la insulina (Richardson H, i cols., 2006).

e) Altres accions

Alguns estudis suggereixen que la metformina podria tenir un efecte a nivell del budell prim disminuint l'absorció de glucosa. El mecanisme exacte no es coneix i es relaciona amb un augment de la oxidació de la glucosa a nivell de l'enteròcit (Ikeda T, i cols., 2000).

La resistència a la insulina s'acompanya de disfunció endotelial. En estudis in vitro la metformina redueix en un 20 % les concentracions de l'inhibidor 1 de l'activador del plasminògen (PAI-1) un dels principals antifibrinolítics. Aquesta acció podria contribuir a explicar la reducció del risc cardiovascular del tractament amb metformina a pacients amb diabetis mellitus tipus 2 (He G, i cols., 2003).

1.4.1 Mecanisme d'acció

Malgrat l'amplia experiència d'ús, el mecanisme d'acció de la metformina no està ben establert. Estudis recents mostren com la metformina augmenta l'activitat tirosín cinasa del receptor d'insulina i activa el IRS-2, en canvi pràcticament no té acció sobre el IRS-1 (Gunton JE, i cols., 2003). Gunton JE i cols., hipotetitzen que la metformina actuaria en el domini cinasa d'unió de la nansa que compren els aminoàcids 591-786, que són fonamentals per l'activació del IRS-2 (Sawka-Verhelle D, i cols., 1996). Aquest fet explicaria el seu efecte fonamentalment hepàtic ja que en el fetge predomina la forma IRS-2 i en el

muscle el IRS-1. Per aquest motiu alguns dels estudis realitzats amb clamp euglucèmic hiperinsulinèmic i metformina en els quals es mesurava bàsicament la captació muscular de glucosa, obtenien resultats negatius (Morel Y, i cols., 1999; Karlsson HK, i cols., 2005). Un cop activat el IRS-2 hi ha un augment de l'entrada de glucosa al fetge gràcies a la translocació del GLUT 1 (Gunton JE, i cols., 2003).

En segon lloc, s'ha descrit *in vivo* i *in vitro* que la metformina augmenta la fosforilació i activació de la proteïncinasa activadora de l'adenosín monofosfat (AMPK) (Musi N, i cols., 2002; Zhou G, i cols., 2001). L'AMPK és un enzim heterotrimèric compost d'una unitat catalítica (α) i dues unitats reguladores (β i γ). Existeixen 2 isoformes de la subunitat catalítica: l'AMPK α 1 que està àmpliament distribuïda i l'AMPK α 2 que se expressa en el fetge, el múscul i el cor. L'AMPK s'activa quan disminueix la ratio ATP/ADP intracel·lular, afavorint l'entrada de glucosa a nivell del múscul, l'oxidació dels àcids grassos, la inhibició de la producció hepàtica de glucosa i la lipogènesi. L'AMPK està sota la influència positiva d'adipocitocines com l'adiponectina i inhibida per la resistina (Banerjee RR, i cols., 2004; Yamauchi T, i cols., 2002). En ratolins, s'ha demostrat que la metformina necessita l'activació de la proteïna treonina cinasa 1 (LKB1) per exercir les seves accions en el fetge. La LKB1 fosforilaria l'AMPK hepàtica; la inhibició de la primera impediria a la metformina disminuir la neoglucogènesi hepàtica tot i que si que s'activaria l'AMPK muscular (Shaw RJ, i cols., 2005). No es pot descartar que aquests efectes de la metformina sobre diferents cinases siguin secundàries a l'activació del receptor insulínic (Gunton JE, i cols., 2003) (Fig.4).

En tercer lloc, la metformina sembla que tindria una acció a nivell mitocondrial, on inhibeix de manera selectiva el complex 1 de la cadena respiratòria (Owen MR, i cols., 2000). Aquesta inhibició de la respiració mitocondrial contribueix a disminuir la neoglucogènesi i indueix la expressió de transportadors de glucosa que faciliten la utilització de glucosa (Kirpichnikov D, i cols., 2002). L'efecte mitocondrial probablement és independent de l'activació de l'AMPK i es produeix amb la utilització de dosis altes de metformina, fet que s'ha relacionat amb el risc d'acidosis làctica que per altra banda, és baix a les dosis habituals (Hawley SA, i cols., 2002). La metformina a dosis altes també inhibeix la fosforilació de la glucosa hepàtica al disminuir les concentracions d'ATP que impedirien l'activació de la glucocinasa independent a l'AMPK (Guigas B, i cols., 2006).

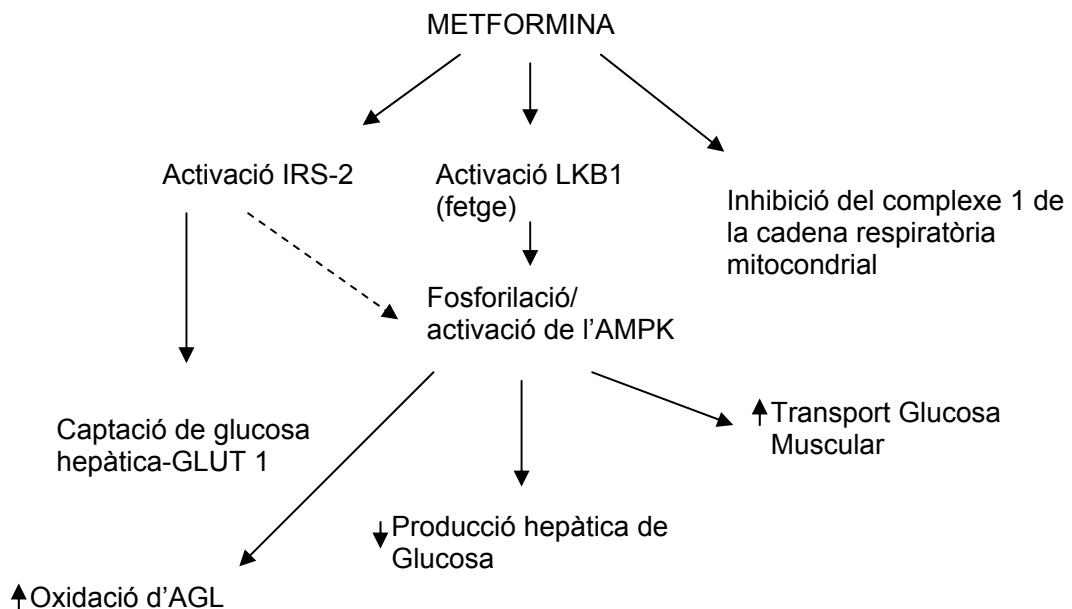


Figura 4: Mecanisme d'acció de la metformina. AMPK: proteïna cinasa activadora de l'adenosín monofosfat (AMP); IRS-2: Substrat 2 del receptor d'insulina; AGL: Àcids grassos lliures; LKB1: Proteïna treonina cinasa 1.

1.4.2 Altres efectes metabòlics de la metformina

L'acció de la metformina sobre la pressió arterial (PA) és controvertida. Estudis realitzats en animals d'experimentació proposen que la metformina tindria un efecte vasodilatador directe similar a la insulina fent relaxar la musculatura llisa arterial (Peuler JD, i cols., 1997) i indirecte augmentant la síntesi d'òxid nítric (Bhalla RC, i cols., 1996). A dosis altes inhibiria l'activitat simpàtica central (Petersen JS i DiBona GF, 1996). Estudis realitzats a pacients hipertensos amb (Giugliano D, i cols., 1993) o sense obesitat (Landin K, i cols., 1991) i a pacients diabètics no hipertensos (Chan JC, i cols., 1993) mostren disminucions significatives de la PA sota tractament amb metformina. Altres treballs però, amb un major nombre de participants no han demostrat efectes importants sobre la PA (DeFronzo RA i Goodman AM, 1995; UKPDS 28) encara que sí disminucions de les concentracions de microalbuminúria (Nagi DK i Yudkin JS, 1993). A l'estudi DPP (Diabetes Prevention Program) la prevalença de HTA va augmentar en els tres grups de tractament tot i que va disminuir la PA sistòlica i diastòlica entre 0,2 i 1,5 mmHg respectivament en els tractats amb metformina (The Diabetes Prevention Program Research Group, 2005).

La influència de la metformina sobre el perfil lipídic és molt variable entre els diferents estudis. A l'inhibir la lipòlisi i la concentració d'AGL, disminueix la síntesi de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) riques en triglicèrids. Els pacients diabètics tractats amb metformina milloren parcialment el perfil lipídic (DeFronzo RA, 1995). S'aconsegueixen reduccions al voltant del 10-20 % del nivell de triglicèrids i del 5-10 % del colesterol total (Giner V i Redón J, 2004). A

l'estudi DPP, el grup tractat amb metformina va disminuir les concentracions de colesterol HDL en 0,3 mg i de triglicèrids en 7,4 mg (The Diabetes Prevention Program Research Group, 2005). Lawrence i cols van demostrar que si bé no hi havia canvis quantitativament significatius sota tractament amb metformina si que existien canvis a la composició de les lipoproteïnes fent-les menys aterogèniques (Lawrence JM, i cols., 2004).

1.4.3 Efectes antiinflamatoris de la metformina

Alguns treballs suggereixen que la metformina podria gaudir d'un efecte antiinflamatori fruit de la interacció resistència a la insulina i inflamació. De fet, en el fetge millora la resistència a la insulina induïda pel TNF- α (Solomon SS, i cols., 1997) i és capaç de revertir la esteatosi hepàtica en ratolins obesos deficientes en leptina el que suggereix un possible efecte inhibidor de la metformina de la expressió hepàtica del TNF- α (Lin HZ, i cols., 2000). En segon lloc la metformina disminueix la producció hepàtica de reactants de fase aguda, com la proteïna C reactiva (Chu NV, i cols., 2002; Haffner S, i cols., 2005; Morin-Papunen L, i cols., 2003). Combinada amb flutamida i anticonceptius orals s'ha comprovat que redueix les concentracions de l'IL-6 a dones amb la síndrome de l'ovari poliquístic (Ibáñez L i De Zegher F, 2004).

1.5 Estudis d'intervenció

Donat que la diabetis mellitus tipus 2 és un problema de salut mundial i que està associada a complicacions microvasculars i macrovasculars, és important intentar prevenir o demorar la seva aparició. En els darrers anys s'han realitzat tot un seguit d'estudis amb aquest objectiu ja sigui mitjançant mesures dietètiques i d'estil de vida o farmacològiques.

1.5.1 Modificacions de l'estil de vida

Les intervencions encaminades a millorar els hàbits alimentaris i d'activitat física s'han mostrat adequats alhora de disminuir el risc de conversió a la diabetis. L'estudi Da Qing realitzat en 577 pacients amb TAG demostrà com la dieta i l'exercici físic disminuïa el risc de desenvolupar diabetis durant un període de 6 anys en un 31 % i un 46 % respectivament (Pan X, i cols., 1997). Un estudi similar realitzat a Nova Zelanda durant 5 anys mostrava bons resultats a l'any (47 front a 67 % casos de diabetis o TAG a l'any) però als 5 anys ja es perdien les diferències ja que els pacients recuperaven pes (Swinburn BA i cols., 2001).

L'estudi finès de prevenció de la diabetis va assignar de manera randomitzada 522 pacients amb TAG a un grup d'intervenció de l'estil de vida (n= 265) i a un grup control (n = 257). Els subjectes amb intervenció rebien consell individualitzat que consistia en la reducció de com a mínim el 5 % del pes corporal, ingesta de greixos inferior al 30 % de les calories totals, menys del 10 % de greixos saturats i fibra dietètica (mínim de 15 g/1000 calories). Al mateix temps es comprometien a realitzar 30 minuts diaris d'exercici moderat. Aquestes recomanacions les rebien durant set vegades el primer any i posteriorment cada

tres mesos fins a finalitzar l'estudi. Els subjectes amb intervenció van perdre 4,2 kg durant els primers 12 mesos a diferència del grup control que va perdre 0,8 kg. Al finalitzar l'estudi (3,2 anys) la incidència acumulada de diabetis en el grup intervingut fou del 11 % respecte al 23 % en el grup control. La reducció total fou del 58 % (Tuomilehto J, i cols., 2001).

1.5.2 Intervencions farmacològiques

Degut a la dificultat en assolir els objectius de modificacions de l'estil de vida, s'han plantejat els fàrmacs com una estratègia més en la prevenció de la diabetis mellitus tipus 2.

a) Primers estudis

A la dècada dels seixanta tenim els primers estudis pioners en les intervencions farmacològiques. L'estudi Whitehall va incloure 204 homes amb TAG definida com aquella glucèmia a les 2 hores d'una sobrecàrrega de 50 g de glucosa entre 120 i 199 mg/ dl o 2 punts de la corba superiors a 180 mg/dl. Es van randomitzar 4 grups de malalts amb 50 mg/d de fenformina front a placebo creuats amb dieta restrictiva amb hidrats de carboni (120 g/d) o bé abstenció de sucres. Després de 5 anys de seguiment la conversió a diabetis fou del 13 % sense diferències entre els grups (Jarret RJ, i cols., 1979). L'estudi Bedford va randomitzar 241 pacients en 4 grups: uns prenien tolbutamida 0,5 g dues vegades al dia i els altres placebo creuat amb dieta restrictiva amb hidrats de carboni o bé abstenció de sucres. La conversió a diabetis entre els grups fou similar al cap de 10 anys, de l'ordre del 15 % (Keen H, i cols., 1982). L'estudi de Malmö en canvi, realitzat a 267 pacients amb TAG seguits durant 10 anys randomitzà 4 grups:

tolbutamida més dieta; placebo més dieta; dieta sola i cap tractament, i mostrà que la incidència de diabetis en el primer grup fou del 0 %, mentre que en els altres fou del 13 i del 29 % respectivament (Sartor G, i cols., 1980).

Posteriorment diferents autors han utilitzat la metformina en assatjos de subjectes amb TAG. L'estudi de Li i cols., mostra com la metformina disminueix la conversió cap a diabetis en tractaments a baixes dosis (750 mg/d) durant un any, respecte al placebo (3 % front a 16,2 %), suggerint que podia ser una opció terapèutica en aquests malalts. Troben millories a la glucèmia basal, la tolerància a la glucosa, la insulinèmia basal i estimulada i la sensibilitat a la insulina mesurada per HOMA. Aquests canvis metabòlics s'acompanyaven de disminucions de l'IMC i el quocient cintura- maluc. No es van detectar canvis de la PA ni del perfil lipídic però sí disminucions de la microalbuminúria (Li CL, i cols., 1999). L'estudi de Morel va obtenir resultats similars a voluntaris obesos amb TAG, és a dir una milloria de la resistència a la insulina, una disminució de la glucèmia, la insulinèmia basal i la PA (Morel Y, i cols., 1999).

b) Estudis randomitzats

En els darrers anys s'han realitzat estudis importants de prevenció de la diabetis mellitus tipus 2 randomitzats en un gran nombre de pacients com són: el Diabetes Prevention Program, l'STOP-NIDDM i l'estudi TRIPOD. L'estudi Diabetes Prevention Program (DPP) es va realitzar en 3234 pacients amb TAG d'una edat mitjana de 51 anys, un 20 % dels quals eren majors de 60 anys i amb un IMC de 34 kg/m². Un 68 % eren dones i un 45 % ètnies africanes i hispàniques. Es van realitzar tres tipus d'intervencions: a) canvis intensius de l'estil de vida que consistien amb dieta amb l'objectiu de perdre un 7 % del seu

pes corporal més 150 minuts d'activitat física a la setmana, b) metformina (850 mg, 2 vegades al dia) més consells dietètics i c) placebo més consells dietètics. Després de 2,8 anys de seguiment (entre 1,8 i 4,6 anys) el grup de modificacions de l'estil de vida va reduir la incidència de diabetis respecte al grup placebo en un 58 % (incidència absoluta del 4,8 %). Calia tractar un total de 6,9 persones per tal d'evitar un cas de diabetis en 3 anys. El grup de metformina va reduir-ho en un 31 % (incidència absoluta del 7,8 %), sent necessari tractar en aquest cas 13,9 persones per tal d'evitar-ne un. El grup control va tenir una incidència absoluta del 11 %. Val a dir que la metformina fou igual d'efectiva que la intervenció de l'estil de vida en els subjectes entre 22 i 44 anys i amb un IMC superior a 35 kg/m². Fonamentalment va millorar la glucèmia basal no així l'HbA1c que va ser inferior en el grup de l'estil de vida (Knowler WC, i cols., 2002). La metformina va augmentar la sensibilitat i la secreció d'insulina, encara que en menor grau que el grup d'intervenció de l'estil de vida (Kitabchi AE, i cols. 2005).

En segon lloc tenim l'estudi STOP-NIDDM que es va realitzar a 1429 pacients amb TAG, 98 % dels quals eren caucàsians, de 55 anys d'edat mitjana i un IMC de 31 kg/m². Es varen randomitzar a dos grups de tractament: acarbosa 50 mg/dia fins a 300 mg/dia i placebo, durant 3,3 anys. En tots ells es van donar consells de dieta i activitat física anuals. Pels criteris nous de diabetis un 8 % del grup d'acarbosa i un 11 % del grup placebo eren diabètics. 211 pacients del grup acarbosa i 130 del grup placebo van acabar abans l'estudi. Al finalitza'l, un 32 % del grup acarbosa i un 42 % del grup placebo esdevingueren diabètics. La reducció relativa de l'acarbosa fou del 32 %. Tres mesos post tractament un 15 % dels pacients del grup acarbosa i un 10 % del grup placebo es convertien en

diabètics; és a dir, l'efecte preventiu es perdia al deixar de prendre el fàrmac (Chiasson JL, i cols., 2002). El tractament amb acarbosa es va associar a una reducció del risc del 49 % (2,5 % de risc absolut) de patir un esdeveniment cardiovascular i una disminució del 91 % de tenir un infart agut de miocardi. També va reduir la incidència de HTA en un 34 % (Chiasson JL, i cols., 2003).

En tercer lloc, l'estudi TRIPOD que es va realitzar a 266 dones hispàniques que havien presentat una diabetis gestacional en els quatre anys previs. Es va voler comprovar l'efecte d'una tiazolidinediona, la troglitazona. Aquests fàrmacs són agonistes del receptor PPAR- γ . Les seves accions fonamentals són induir la diferenciació de l'adipòcit, millorar la resistència a la insulina i augmentar el dipòsit de greix subcutani en detriment del compartiment intrabdominal. Les dones que participaren en l'estudi tenien una edat mitjana de 35 anys i un IMC de 30 kg/m². Es van randomitzar a dos grups: l'un prenia troglitazona 400 mg/d (n= 114) i l'altre placebo (n = 122). El 70 % tenien TAG. Es varen realitzar anualment TTOG i un test intravenós de tolerància a la glucosa (IVGTT) als 3 mesos. La incidència anual de diabetis en el grup de troglitazona al cap de 2,5 anys fou del 5,4 % i en el grup placebo del 12,1 %, és a dir, una reducció relativa del 55 %. Existia un efecte individual, subjectes responedors, en els quals millorava la glucèmia, la insulinèmia basal i la resistència a la insulina, mentre que en altres no succeïa aquest fet. La funció cel·lular beta millorava i l'efecte del fàrmac es mantenia vuit mesos després de haver-lo suspès (Buchanan TA, i cols., 2002).

c) Altres estudis

Altres agents farmacològics com els antihipertensius, les estatines, els fibrats i els estrògens però amb anàlisis posthoc han mostrat disminucions en la incidència de diabetis mellitus tipus 2. Dintre d'aquest grup cal destacar diferents estudis: El primer és l'orlistat, un inhibidor de les lipases intestinals, que va mostrar en l'estudi Xendos, com els pacients que prenen el fàrmac perdien més pes (6,7 kg) respecte al grup placebo (3,8 kg) i desenvolupaven menys diabetis (3 % front a 7,6 % amb placebo). Es varen seguir 675 participants obesos, 120 dels quals presentaven TAG, durant 582 dies (Heymsfield SB, i cols., 2000).

Yusuf S, i cols., van analitzar la incidència de diabetis tipus 2 a l'estudi d'avaluació de la prevenció d'esdeveniments cardíacs (HOPE) realitzat a 5720 voluntaris més grans de 55 anys no diabètics i que havien tingut un esdeveniment cardiovascular. Un 3,6 % dels pacients que varen ser randomitzats a prendre fins a 10 mg de ramipril durant un seguiment de 4,5 anys van desenvolupar diabetis, respecte un 5,4 % del grup placebo (Yusuf S, i cols., 2001). En un altre estudi d'intervenció amb losartan per la reducció d'esdeveniments cardiovasculars (LIFE), varen assignar a 9193 pacients hipertensos a un tractament amb losartan front a atenolol. Al finalitzar l'estudi, varen observar una disminució de la incidència de diabetis d'un 24 % (6 % en el grup de losartan i 9 % en el grup placebo). Posteriorment a l'estudi VALUE es va observar com la incidència de diabetis tipus 2 era menor en els subjectes hipertensos tractats amb valsartan respecte als tractats amb amlodipino (Julius S, i cols., 2004). Quedava encetada la qüestió de si els inhibidors o bloquejadors del sistema renina-angiotensina podien tenir un paper sensibilitzant de l'acció insulínica (Dahlof B, i cols., 2002).

L'estudi de Prevenció Coronària de l'Oest d'Escòcia (WOSCOPS) que va randomitzar a 6595 homes hipercolesterolèmics a pravastatina front a placebo; va trobar en un anàlisi secundari una reducció del desenvolupament de diabetis del 31 %. Aquest fet l'atribuïen a un possible efecte antiinflamatori de la pravastatina (Freeman DJ, i cols., 2001). Un anàlisi posterior de l'assaig de Prevenció de l'Infart amb Bezafibrat va mostrar una reducció de la incidència de diabetis del 54 % al 42 % amb el tractament amb bezafibrat comparat amb placebo (Tenenbaum A, i cols., 2004).

Diferents estudis han examinat l'associació existent entre l'ús d'estrògens i la incidència de diabetis, encara que no sempre ajustats per factors importants com els nivells de glucèmia i el pes (Rossi R, i cols., 2004). Cal destacar l'Estudi Cardíac de Tractament amb Estrògens i Progestàgens que va reportar que el tractament combinat d'estrògens i progestàgens disminuïa la incidència de diabetis del 9,5 % al 6,2 % comparat amb el placebo (Kanaya AM, i cols., 2003).

Per assegurar que realment s'està prevenint la malaltia, són necessaris més estudis amb un temps de seguiment lo suficientment llarg i que tinguin com a objectiu primari, la incidència de diabetis mellitus tipus 2.

2 HIPÒTESI I OBJECTIUS

Els familiars de primer grau dels pacients diabètics tipus 2 presenten un risc més alt de desenvolupar la diabetis mellitus tipus 2. L'estudi d'aquests individus en la primera part del treball ens permet detectar en una fase preclínica defectes metabòlics a nivell de la sensibilitat a la insulina i /o la secreció beta pancreàtica. Molts d'aquests pacients presentaran trets de la síndrome metabòlica. La detecció d'individus a risc és important a l'hora de desenvolupar estratègies preventives específiques ja siguin higiènic-dietètiques o farmacològiques per tal de prevenir o retardar el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 2.

La metformina és un fàrmac clàssic utilitzat a Europa pel tractament de la diabetis mellitus tipus 2 des de fa més de trenta anys. El seu mecanisme d'acció no és del tot conegut. Fonamentalment inhibeix la neoglucogènesi hepàtica durant el dejú i en menor grau la glucogenolisi. Els pacients amb tolerància alterada a la glucosa presenten alteracions variables de la secreció i la sensibilitat a la insulina. La utilització de fàrmacs sensibilitzadors de la insulina pot millorar l'hiperglucèmia i els diferents paràmetres de la síndrome metabòlica que tenen aquests pacients. No es coneix si el tractament amb metformina serà capaç de revertir l'estat pro-inflamatori associat a la resistència a la insulina.

Els objectius concrets del treball foren:

I.- Estudi dels familiars de primer grau dels pacients diabètics tipus 2:

- 1 Avaluar el grau de resistència a la insulina.
- 2 Determinar la capacitat secretora de la cèl·lula beta pancreàtica i la secreció de proinsulina.

3 Estudiar els trets de la síndrome metabòlica

II.- Estudi dels efectes del tractament amb metformina a pacients amb tolerància alterada a la glucosa:

1 Accions metabòliques:

- a. Avaluar la milloria de la tolerància a la glucosa.
- b. Valorar els canvis sobre la funció cel·lular beta i la sensibilitat a la insulina.
- c. Avaluar els efectes de la metformina sobre la pressió arterial i el perfil lipídic.

2 Accions antiinflamatòries:

- a. Determinar l'efecte de la metformina sobre el nombre de leucòcits.
- b. Estudiar la relació de la metformina amb els factors solubles del receptor del TNF- α (sTNFR 1 i sTNFR 2).
- c. Avaluar l'acció de la metformina sobre la interleucina 18 i el perfil bioquímic hepàtic.
- d. Valorar l'efecte de la metformina sobre les concentracions de BPI i de LBP.

3 METODOLOGIA

3.1 Pacients i mètodes estudi I: Els familiars dels pacients diabètics tipus 2

3.1.1 Pacients

Des de 1993 a 1995 es va proposar participar en aquest estudi a familiars de primer grau de pacients diabètics tipus 2 segons criteris del National Diabetes Data Group (NDDG, 1979) que es visitaven a consultes externes del servei d'endocrinologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Varen acceptar 86 familiars de 61 pacients diabètics, dels quals 71 n'eren fills i 15 n'eren germans. Els criteris d'inclusió foren:

- a) edat entre 18 i 62 anys
- b) absència de malaltia i/o tractament farmacològic capaç d'afectar la secreció o la sensibilitat a la insulina
- c) no diabetis ni TAG coneguda

Simultàniament vàrem estudiar un grup de 49 subjectes control normoglicèmics sense antecedents familiars de diabetis d'igual sexe, edat i IMC. Tots els pacients varen signar un consentiment informat. Se'ls hi va fer una exploració física que incloïa: pes, alçada, PA després de 5 minuts de repòs en sedestació i perímetre de cintura i maluc. Es realitzà una analítica general incloent: perfil lipídic, funció hepàtica i renal (Autoanalitzador Hitachi 917).

3.1.2 Avaluació de la resistència a la insulina

La resistència a la insulina es va mesurar mitjançant el test de HOMA computaritzat a partir de la mitjana de tres determinacions d'insulinèmies i

glucèmies basals en els temps -10, -5 i 0 minuts (Matthews DR, i cols., 1985). Aquest test manté una bona correlació ($r= 0,78- 0,88$) amb el mètode de referència: el clamp euglicèmic hiperinsulinèmic (Bonora E, i cols., 2000; Wallace TM, i cols., 2004).

La glucèmia es va mesurar pel mètode de la glucosa oxidasa utilitzant un Autoanalitzador Hitachi. Les insulines es mesuraren mitjançant RIA (INS-RIA-100, Medgenix Diagnostics, Fleurus, Bèlgica). El coeficient de variació intrassaig i interassaig fou del 6 % i 7,3 % respectivament. La reactivitat creuada amb la proinsulina era del 40 %.

3.1.3 Mesura de la secreció d'insulina

Per mesurar el funcionalisme de les cèl·lules beta es va utilitzar el mètode CIGMA (Hosker JP, i cols., 1985). Consisteix en una infusió contínua intravenosa de glucosa (5 mg/ kg pes ideal x min) d'una solució de glucosa al 10 % durant 60 minuts.

Per la seva realització es col·loca una cànula a una vena del braç on prèviament s'hi ha posat una estora elèctrica per tal de treure sang arterialitzada. Es realitzen 3 determinacions de glucosa, insulina i C-peptid en el període basal (temps: -10, -5 i 0 minuts) i estimulat (50, 55 i 60 minuts). La prova es practica al matí, en dejú després d'una ingesta mínima de 150 g d'hidrats de carboni els tres dies previs. Les dones en edat fèrtil es van estudiar en els primers 10 dies del cicle menstrual (Valdes CT i Elking-Hirsch E, 1991). Per el càlcul del pes ideal es varen fer servir les taules utilitzades en la validació del test (MLI Companyia Metropolitan Life Insurance Co, 1959).

Els subjectes amb una glucèmia basal superior a 140 mg/dl varen ser exclosos de l'estudi. El funcionalisme beta es calculà per CIGMA a partir dels valors de glucèmia i de C-pèptid estimulat. Els resultats s'expressaren en forma de percentatges en relació a les respostes d'un grup control de voluntaris sans i prims sense història familiar de diabetis mellitus que es van utilitzar per validar el mètode. Aquest test presenta una correlació amb el clamp hiperglucèmic hiperinsulinèmic del 0,92 (Davis SN, i cols., 1992; Levy JC, i cols., 1991).

El C-pèptid es va mesurar utilitzant un radioimmunoassaig amb doble anticòs (Laboratoris Daichii). Els coeficients de variació intrassaig i interassaig foren del 5,4 % i del 10 %, respectivament.

Vam anomenar tolerància alterada per CIGMA (TAC), a aquells pacients que presentaven una glucèmia basal i/o estimulada superior a la mitja més dues desviacions estàndards observades en el grup control: 6.2 mmol/l (111,6 mg/dl) i 10.5 mmol/l (189 mg/dl) respectivament.

3.1.4 Avaluació de la secreció de proinsulina

En un subgrup de 23 familiars i 24 subjectes control, vàrem determinar les concentracions de proinsulina en els temps -10, -5 i 0 minuts i 50, 55 i 60 minuts del test CIGMA. La proinsulina es va mesurar pel mètode ELISA utilitzant doble anticòs contra el C-pèptid i la insulina. Els coeficients de variació interassaig foren del 4,7 % a una mitja de 2,25 pmol/l, 6,7 % a 5,1 pmol/l i 8,7 % a 10 pmol/l. Les quatre principals isoformes de la proinsulina tenien un 100 % de reacció creuada (Kjems LL, i cols., 1993).

3.2 Pacients i mètodes estudi II: Assaig doble cec de metformina front a placebo en pacients amb tolerància alterada a la glucosa

3.2.1 Pacients

Els participants procedien de les consultes externes de la unitat de diabetis, endocrinologia i nutrició de l' Hospital Universitari de Girona Dr Josep Trueta.

Els criteris d' inclusió foren:

- a) edat entre 30 i 65 anys,
- b) les dones s'inclouen si hi havia esterilitat quirúrgica, eren menopàusiques o si utilitzaven anticoncepció,
- c) índex de massa corporal (IMC) entre 22 i 35 kg/ m²,
- d) TAG demostrada mitjançant un TTOG fet 2 mesos abans de començar l'estudi o bé una glucosa basal entre 110 i 140 mg/ dl,
- e) estabilitat de la dieta i l'exercici en els 2 mesos previs.

Tots els pacients van signar un consentiment informat. Els criteris d'exclusió foren:

- a) pacients diabètics segons els criteris del National Diabetes Data Group de 1979 (NDDG, 1979),
- b) dones gestants i lactants
- c) pacients amb alteració de la funció renal definida com una creatinina plasmàtica igual o per sobre de 1,5 mg/ dl pels homes i 1,4 mg/ dl per les dones,

- d) pacients amb insuficiència cardíaca o respiratòria capaç de produir hipòxia central o disminució de la perfusió perifèrica,
- e) antecedents d'acidosis làctica,
- f) hipertensió arterial (HTA) no controlada
- g) infecció aguda o crònica
- h) malaltia hepàtica demostrada per elevació dels enzims hepàtics 2,5 vegades per sobre del límit superior de la normalitat o abús d'alcohol
- i) ús de fàrmacs que poguessin alterar la tolerància a la glucosa,
- j) participants en un altre estudi clínic en els darrers 30 dies
- k) incapacitat legal.

L'estudi es va realitzar d'acord amb els principis de la Declaració de Helsinki (versió revisada de Hong Kong 1989) i la "Guia de bona pràctica clínica per estudis amb productes mèdics de la Comunitat Europea". Va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Universitari de Girona Dr Josep Trueta i el Ministeri de Sanitat que li va assignar el número 97/337.

Es van randomitzar trenta un pacients per prendre comprimits de placebo o metformina subministrats pel laboratori LIPHA segons el programa RANCODE +3.1. Una dietista va donar consells dietètics individualitzats a l'inici de l'estudi per tal d'assegurar un pes estable al llarg del mateix. Dos mesos després de la primera visita (visita 2) els pacients iniciaven el tractament amb metformina o placebo. La primera setmana prenen 1 comprimit de 850 mg al dia i posteriorment 2 comprimits al dia (1 després d'esmorzar i 1 després de sopar) completant un total de 12 setmanes. Per assegurar el compliment farmacològic es

contaven els comprimits sobrants a totes les visites i així mateix s'annotaven els efectes secundaris tant a la visita 3 (a les 6 setmanes) com a la visita 4 (a les 12 setmanes, fi de l'estudi). Es recollia també el tractament concomitant amb altres fàrmacs. A totes les visites es realitzava una exploració física on es mesurava el pes, l'IMC, el perímetre de la cintura i maluc i la pressió arterial després de 5 minuts de repòs (esfigmomanòmetre: BP-103N-Mark III, Nippon Colin, Co. LTD, Japó).

Les anàlisis de sang es realitzaren abans de la randomització i al final de l'estudi i consistien en: un hemograma, una glucèmia basal mesurada per un mètode fotomètric (Hitachi Autoanalitzador modular P800, Roche Diagnostics), un perfil lipídic, creatinina, ionograma, perfil hepàtic (Autoanalitzador Hitachi 917, Roche Diagnostics) i la determinació d'albumina a l'orina de 24 hores per un mètode immunoturbimètric. Per estudiar la tolerància hidrocbonada es va realitzar un TTOG després d'una nit de dejú i d'una ingesta mínima de 150 g d'hidrats de carboni els tres dies previs.

3.2.2 Mètodes analítics: Insulina i C-pèptid

La sensibilitat a la insulina es va mesurar pel test de HOMA (descriu a l'apartat 3.1.2). En aquest estudi les insulines es mesuraren mitjançant IRMA (Medgenix Diagnostics, Fleurus, Bèlgica). El seu nivell de detecció fou de 4 mU/L amb un coeficient de variació intrassaig i interassaig de 5,2 % i 6,9 % respectivament a una concentració de 10 mU/L i de 3,4 % i 4,5 % a una concentració de 130 mU/L. No hi havia reactivitat creuada amb la proinsulina i el C-pèptid.

L'estudi del funcionalisme beta pancreàtic es va realitzar pel mètode CIGMA (descriu a l'apartat 3.1.3). El C-pèptid es va mesurar per RIA (Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Alemanya). El nivell de detecció fou de 0,1 ng/ml i els coeficients de variació intrassaig i interassaig foren de 2,6 % i 4,4 % respectivament. Presentava una reactivitat creuada del 25 % amb la proinsulina però no amb la insulina.

3.2.3 Determinació de les fraccions solubles dels receptors del TNF- α i la IL-18

Les concentracions plasmàtiques de les fraccions solubles del receptor 1 del TNF- α (sTNFR1) i del 2 (sTNFR2) van ser mesurades mitjançant un enzim immunoassaig d'alta sensibilitat de fase sòlida (EASIA, Medgenix sTNFR1 i sTNFR2 EASIA BioSource Europe S.A., Zoning Industriel B-6220, Fleunes, Bèlgica). La sensibilitat de l'assaig fou de 0,1 ng/ml i va ser definida com la concentració de sTNFR1 i sTNFR2 corresponents a la mitjana de densitat òptica de 20 replicats del 0 estandar + 2 desviacions estàndards. Els coeficients de variació intrassaig i interassaig foren inferiors al 7% i al 9% respectivament. L'EASIA del sTNFR1 no tenia reacció creuada amb el sTNFR2. El TNF- α tampoc interferia amb l'assaig.

Les concentracions d'interleucina 18 es van determinar per un enzim immunoassaig de doble anticòs (Human IL-18 ELISA Kit; Medical & Biological Laboratories Co. Ltd., Nagoya, Japó). La sensibilitat de l'assaig fou de 12,5 ng/L i presentava uns coeficients de variació intrassaig del 7,3 % i interassaig del 7,5 %.

3.2.4 Determinacions de la BPI i la LBP

La concentració de BPI es va determinar en mostres de plasma EDTA mitjançant un enzim-immunoassaig (ELISA) tipus sandvitx (Human BPI ELISA assaig, HyCult biotechnology b.v.; PB Uden, Holanda). El dintell de detecció fou de 250 pg/ml i els coeficients de variació intrassaig i interassaig foren inferiors al 5%.

La LBP es va determinar en mostres de sèrum mitjançant un assaig ELISA (Human LBP ELISA assaig HyCult biotechnology b.v.; PB Uden, Holanda). Prèviament foren diluïdes al 1000 seguint les instruccions del fabricant. L'assaig te una sensibilitat de 1 ng/ml i un rang de mesura entre 0,8 i 50 ng/ml. Els coeficients de variació intrassaig i interassaig estaven entre el 5 i el 10% respectivament.

3.3 Anàlisi estadística

Per l'assaig amb metformina es va estimar una mostra de 15 pacients a cada grup per detectar diferències a la glucosa estimulada de més de 18 mg/dl, considerant una pèrdua del 10 %. L'error α i β fou de 0,05 i 0,1 respectivament en un test unilateral.

Les variables contínues s'expressaren com la mitjana més la desviació estàndar. Per la comparació de variables paramètriques s'utilitzà la t de student i per les no paramètriques (el test de l'*U* de Mann-Whitney i el test de Kruskal-Wallis per les comparacions múltiples). La comparació de freqüències es va fer amb el test de la *ji* al quadrat.

A l'estudi II, per l'anàlisi dels objectius finals entre grups vam utilitzar el model general lineal d'anàlisi de la variança per a mesures repetides. El nivell de significància estadística fou del 5 % i el programa estadístic utilitzat el SPSS10.0 (1999 SPSS Inc, Chicago, IL).

4 RESULTATS

4.1 Resultats estudi I: Els familiars dels pacients diabètics tipus 2

4.1.1 Sensibilitat i secreció d'insulina

Les característiques clíniques dels 86 familiars i els 49 participants controls es descriuen a la taula 1. Ambdós grups eren d'una mateixa edat, sexe i IMC. Els familiars tenien valors de glucèmia basal [5.3 mmol/l (95,4 mg/dl) front a 5 mmol/l (90 mg/dl) $p= 0.02$] i estimulada [9.1 mmol/l (163,8 mg/dl) front a 8.4 mmol/l (151,2 mg/dl), $p= 0.01$] més elevats que el grup control. La sensibilitat a la insulina [Familiars (F): 37 % front a Controls (C): 43 %, $p= 0,002$] i la secreció d'insulina (F: 128 % front a C: 145 %, $p= 0,007$) eren inferiors en els individus familiars.

Posteriorment es va analitzar si aquests paràmetres es modificaven amb l'edat, pel que es van dividir als subjectes en tertils: grup joves: A (< 28 anys), grup intermig: B (28 – 37 anys), grup més gran: C (> 37 anys). El grup de familiars i controls eren del mateix sexe i IMC. La glucèmia basal augmentava amb l'edat en els familiars [grup A: 5,1 mmol/l (91,8 mg/dl), B: 5,3 mmol/l (95,4 mg/dl), C: 5,7 mmol/l (102,6 mg/dl), $p= 0,0001$] i el mateix succeïa amb la glucèmia estimulada [grup A: 8,3 mmol/l (149,4 mg/dl), B: 9,1 mmol/l (163,8 mg/dl), C: 9,3 mmol/l (167,4 mg/dl), $p= 0,03$]. La funció cel·lular beta disminuïa amb l'edat en els familiars (grup A: 139 %, B: 134 %, C: 111 %, $p= 0,002$). La sensibilitat a la insulina era més baixa en el tercil inferior d'edat dels individus familiars (37 front a 57 %, $p < 0,01$) i no es modificava amb l'edat (familiars 37 a

40 %, controls 57 a 40 %). Aquest fenomen no s'observava en els individus controls.

Els familiars que presentaven tolerància alterada a la glucosa per CIGMA (TAC) eren 19 (10 tenien alterada la glucosa basal i 15 l'estimulada). La prevalència de TAC era més alta en el grup C de més edat (A: 14,8 %, B: 10 %, C: 41,4 %, $p= 0,009$). Els familiars amb TAC eren de major edat i presentaven concentracions d'insulinèmia basal més altes i una sensibilitat a la insulina i funció cel·lular beta inferior als individus amb una tolerància normal a la glucosa per CIGMA (TNC) (Taula 2).

Posteriorment es van dividir els subjectes familiars amb TNC; en dos grups segons l'edat i es van comparar entre ells i amb el grup control estratificat per edat. Els pacients familiars més joves (< 28 anys) són com a grup més resistents a la insulina que el grup jove control (HOMA 37 % vs 57 %, $p < 0,001$) i presenten un hiperinsulinisme basal (10,3 vs 6,6 mUu/l, $p < 0,01$) sense que existeixen en aquest nivell diferències en la glucèmia ni en la funció cel·lular beta. Aquestes diferències no es poden atribuir a l'obesitat, ja que si analitzem el grup de pacients amb $IMC < 27 \text{ kg/m}^2$, persisteixen les diferències en la sensibilitat a la insulina ($p= 0,003$). Els familiars de més edat presenten respecte al grup control una funció cel·lular beta inferior (funció beta: 133 % front a 147 %, $p < 0,05$) i més hiperglucèmia estimulada (158,4 mg/dl vs 149,4 mg/dl, $p < 0,05$). Els familiars de més edat respecte als familiars més joves són més hiperglucèmics i presenten una menor funció cel·lular beta (Taula 3) (Fernández-Castañer M, i cols., 1996).

4.1.2 La secreció de proinsulina

En un subgrup de 33 participants familiars (F) i 24 controls (C) es van mesurar les concentracions de proinsulina en situació basal (F: $8,5 \pm 7,6$ pmol/l i C: $9,5 \pm 10,5$ pmol/l, $p= 0,68$) i estimulada amb el test de CIGMA (F: $20 \pm 14,4$ pmol/l i C: $22,4 \pm 16,7$ pmol/l, $p= 0,55$) no trobant diferències significatives. Tampoc ho varen ser els quocients proinsulina/ insulina basals (F: $0,09 \pm 0,07$ i C: $0,11 \pm 0,08$, $p= 0,14$) i postestímul (F: $0,09 \pm 0,04$ i C: $0,11 \pm 0,06$, $p= 0,12$) (Taula 4).

A continuació es van comparar les concentracions de proinsulina entre els familiars amb TNC front als que presentaven TAC. Els familiars amb TAC ($n= 8$) presentaven unes concentracions de proinsulina basal similars als subjectes amb TNC ($n=25$) (TAC: $7,4 \pm 5,1$ pmol/l, i TNC: $8,8 \pm 8,4$ pmol/l, $p= 0,8$). Igualment eren equivalents les determinacions de proinsulina estimulada (TAC: $16,5 \pm 6,2$ pmol/l, i TNC: $21,1 \pm 16,2$ pmol/l, $p= 0,7$) així com els índex proinsulina/insulina basals (TAC: $0,07 \pm 0,02$ i TNC: $0,1 \pm 0,08$, $p= 0,5$) i els índex proinsulina/insulina estimulats per CIGMA (TAC: $0,08 \pm 0,02$ i TNC: $0,09 \pm 0,04$, $p= 0,5$) (Taula 5).

4.1.3 La síndrome metabòlica en el grup de familiars

Posteriorment es van classificar als familiars dels pacients diabètics en dos grups en relació al percentil 33 de la sensibilitat a la insulina de la població control. Aquesta sensibilitat es va classificar en baixa (B) quan era inferior al percentil 33 i mitja quan era superior (M). L'estudi comparatiu entre els dos grups

es representa a la taula 6. El grup de familiars amb la sensibilitat a la insulina més baixa tenien més edat ($37,7 \pm 13$ front a $32,7 \pm 11,6$; $p= 0,037$), un major IMC ($29,4 \pm 5$ front a $25,1 \pm 3,3$; $p< 0,001$), una PA arterial diastòlica ($128,1 \pm 14,7$ front a $118,2 \pm 14,9$; $p= 0,004$) i sistòlica ($80,1 \pm 9,9$ front a $74,6 \pm 9,4$; $p= 0,011$) més elevada, més hiperglucèmia ($103,8 \pm 18,4$ front a $92,3 \pm 10,4$; $p< 0,001$) i hipertrigliceridèmia ($124,4 \pm 66,5$ front a $93,5 \pm 45,2$; $p= 0,022$) (Taula 6).

Es van determinar els components de la síndrome metabòlica segons l'ATP III en els dos grups de pacients. Els familiars més resistents a la insulina presentaven en un 53,6 % les característiques de la síndrome metabòlica respecte un 7,3 % dels més sensibles a la insulina ($p<0,001$). Per criteris les diferències fonamentals es trobaren en la circumferència de la cintura, la hiperglucèmia i les concentracions més baixes de colesterol HDL. Per contra els percentatges de HTA i de hipertrigliceridèmia eren similars (Taula 6).

4.2 Resultats estudi II: Assaig doble cec de metformina front a placebo en pacients amb tolerància alterada a la glucosa

4.2.1 Efectes metabòlics de la metformina

D'entre 118 subjectes preseleccionats, es van randomitzar 31 pacients per participar en aquest estudi (16 van ser assignats per prendre metformina i 15 per prendre placebo). Sis pacients abandonaren l'estudi posteriorment a la randomització (3 del grup de metformina i 3 del grup placebo), tots ells per raons personals. Es van excloure 2 pacients no complidors del tractament (els dos pertanyents al grup de metformina). Finalment es van analitzar 23 pacients (11 del grup de metformina i 12 del placebo).

La taula 7 mostra les característiques basals dels pacients analitzats. Tots ells eren d'edat, sexe i IMC similars. Sis pacients del grup de metformina i cinc pacients del grup placebo tenien antecedents familiars de diabetis tipus 2. Nou pacients del grup de metformina presentaven TAG i dos AGB; en el grup placebo set pacients tenien TAG i cinc AGB, no sent les diferències estadísticament significatives. Les concentracions de glucosa, insulina i C-pèptid eren semblants. La sensibilitat a la insulina i la funció cel·lular beta eren també comparables (Taula 7).

Després de 12 setmanes de tractament, la glucosa en dejú va disminuir en el grup de metformina (metformina (M): $110,1 \pm 9,9$ mg/dl fins a $98,9 \pm 15,7$ mg/dl front a placebo (P): $106,9 \pm 8,9$ mg/dl a $106,3 \pm 6,5$ mg/dl, $p= 0,004$). Les concentracions d'insulina basal (M: $11,6 \pm 5,4$ mU/l a $8,8 \pm 3,5$ mU/l i P: $11,2 \pm 3,3$ mU/l a $11,5 \pm 3,3$ mU/l, $p= 0,05$), C-pèptid basal (M: $2,5 \pm 0,7$ ng/ml a $1,8 \pm$

0,5 ng/ml i P: $2,1 \pm 0,7$ ng/ml a $2,0 \pm 0,8$ ng/ml, $p= 0,02$) i C-pèptid estimulat (M: $5,2 \pm 1,2$ ng/ml a $4,2 \pm 1$ ng/ml i P: $4,4 \pm 1,4$ ng/ml a $4,5 \pm 1,5$ ng/ml, $p= 0,02$) foren estadísticament més baixos després del tractament amb metformina i no es modificaren en el grup placebo. La sensibilitat a la insulina mesurada pel mètode HOMA va millorar també en els pacients que van rebre metformina i no va canviar en els que van prendre placebo (M: $37,4 \pm 15,2$ % a $50,4 \pm 23,2$ % i P: $35,4 \pm 10,1$ % a $34,6 \pm 9,9$ %, $p= 0,02$). El funcionalisme beta pancreàtic no va canviar de manera significativa en cap dels dos grups (Taula 7).

No es van observar diferències en el IMC o en el quocient cintura / maluc durant l'estudi (Taula 7). Només quatre pacients (17,4 %) van referir efectes secundaris: 2 pacients van tenir diarrea (8,7%, ambdós en el grup de metformina) i 2 subjectes van presentar pirosis i nàusees (8,7 %, ambdós en el grup placebo). No hi va haver diferències significatives en els efectes adversos entre els dos grups ($p= 0,2$).

El perfil lipídic no es va modificar després del tractament amb metformina ni tampoc la pressió arterial sistòlica i diastòlica. Les concentracions de microalbuminúria es van mantenir estables (Taula 8).

4.2.2 Efectes antiinflamatoris de la metformina

En primer lloc es va analitzar el recompte leucocitari abans i després del tractament amb metformina. El grup amb metformina es va mantenir estable i va disminuir encara que de manera clínicament no significativa en el grup placebo (Taula 9).

La mesura dels sTNFRs fou similar en els dos grups a l'inici de l'estudi i no es va modificar de forma estadísticament significativa després del tractament amb metformina en front al placebo: sTNFR1 (M: $2,0 \pm 0,8$ mcg/l a $2,3 \pm 1,2$ mcg/l i P: $1,7 \pm 0,4$ mcg/l a $2,2 \pm 1,0$ mcg/l, $p=0,6$) i sTNFR2 (M: $4,8 \pm 1,7$ mcg/l a $4,4 \pm 1,2$ mcg/l i P: $5,1 \pm 1,9$ mcg/l a $4,8 \pm 2,0$ mcg/l, $p=0,8$) (Taula 9).

Respecte al perfil bioquímic hepàtic es va comprovar com la metformina disminuïa les concentracions de les transaminases ALT (M: $28,9 \pm 17,3$ U/L a $22 \pm 8,4$ U/L front a P: $22,9 \pm 10$ U/L a $24,6 \pm 11,4$ U/L, $p=0,03$) i AST (M: $24,2 \pm 4,3$ U/L a $17,9 \pm 5,4$ U/L front a P: $15,5 \pm 3,7$ U/L a $16,1 \pm 1,7$ U/L, $p=0,01$). No van haver canvis de la GGT ni de la FA. Tampoc van haver diferències en les concentracions d'interleucina 18 (M: $172,1 \pm 33,5$ a $188,2 \pm 82,9$ i P: $172 \pm 72,8$ a $174,5 \pm 85,3$; $p=0,8$) (Taula 9).

Paral·lelament als canvis observats de la sensibilitat a la insulina es va observar increment de les concentracions plasmàtiques de BPI en el grup de metformina respecte al grup placebo (M: 2,75 (1,26-7,73) a 7,49 (2,56-38,8) i P: 3,24 (1,58-5,3) a 2,34 (1,06-8,2), $p=0,03$). La LBP no es va modificar (M: 37 (25,6-60,3) a 44,9 (36,6-84,7) i P: 41,7 (29,8-82,8) a 36,8 (30,4-50,4), $p=0,4$) en cap dels dos grups de tractament (Taula 9).

4.3 TAULES

4.3.1 Taula 1. Estudi I: Característiques clíniques dels familiars i controls

	Controls n= 49	Familiars n= 86	p
Sexe (homes/ dones)	27/22	50/36	n.s.
Edat (anys)	30 (22,5-40)	33 (24-42)	n.s.
IMC (Kg/m ²)	24,5 (23-28,3)	25,8 (23,6-29,8)	n.s.
Glucosa basal (mg/dl)	90 (82,8-97,2)	95,4 (88,2-102,6)	0,02
Glucosa estimulada (mg/dl)	151,2 (142,2 -169,2)	163,8 (145,8 – 178,2)	0,01
Insulina basal (mU/l)	8,6 (5,8-9,3)	10,4 (8,4-14,4)	0,004
C-pèptid basal (ng/ml)	2,5 (2 -3,3)	2,9 (2,1- 3,6)	n.s.
Insulina estimulada (mU/l)	20 (15,3 - 36,1)	26,5 (19,6 - 31,8)	n.s.
C-pèptid estimulat (ng/ml)	6,2 (5,5 - 7,4)	6,6 (5,2 - 8,1)	n.s.
Sensibilitat HOMA (%)	43 (30 – 66)	37 (28 – 46)	0,002
Funció cel·lular beta CIGMA (%)	145 (123 – 166)	128 (109 – 149)	0,007

Les dades s'expressen com a mediana (rang intercuartil). Les diferències mesurades pel test U de Mann-Whitney o ji al quadrat. n.s.: $p > 0,05$. IMC: Índex de massa corporal, HOMA: Homeostasi segons el model, CIGMA: Infusió contínua de glucosa amb valoració segons el model.

4.3.2 Taula 2. Estudi I: Diferències metabòliques entre els familiars amb tolerància alterada a la glucosa per CIGMA i els normoglicèmics

	TNC	TAC	p
Sexe (homes/ dones)	35/32	15/4	0,037
Edat (anys)	31 (24 - 38)	43 (31- 48)	0,005
IMC (Kg/m ²)	26,2 (23,8 - 29,8)	25,8 (23,3-28,9)	n.s.
Glucosa basal (mg/dl)	91,8 (86,4-100,8)	115,2 (102,6-133,2)	0,000
Glucosa estimulada (mg/dl)	156,6 (144 -167,4)	192,6 (189 – 203,4)	0,000
Insulina basal (mU/l)	10 (8,2-9,3)	11,5 (8,4-14,4)	0,004
C-pèptid basal (ng/ml)	2,7 (2 -3,3)	3,4 (2,8- 4)	0,008
Insulina estimulada (mU/l)	24,6 (18 - 35)	33,9 (23,5 - 43,7)	n.s.
C-pèptid estimulat (ng/ml)	6,2 (5 - 7,7)	7,1 (5,7 - 8,6)	n.s.
Sensibilitat HOMA (%)	38 (28 – 47)	30 (24 – 36)	0,021
Funció cel·lular beta CIGMA (%)	138 (112 – 169)	108 (82 – 118)	0,000

Les dades s'expressen com a mediana (rang intercuartil). Les diferències mesurades pel test U de Mann-Whitney o ji al quadrat. n.s.:p > 0,05.TNC: Tolerància a la glucosa normal per CIGMA, TAC: Tolerància a la glucosa alterada per CIGMA, IMC: Índex de massa corporal, HOMA: Homeostasi segons el model, CIGMA: Infusió contínua de glucosa amb valoració segons el model.

4.3.3 Taula 3. Estudi I: Característiques metabòliques dels familiars normoglicèmics i el controls estratificats en grups d'edat.

	Controls		p	Familiars		p
n	16	33		23	44	
Edat (anys)	18-27	28-61		17-27	28-61	
IMC (Kg/m ²)	23,3 (21,3 - 24,4)	25,6 (23,4-29,3)	0,003	24,5 ^a (22,9-29,8)	26,5 (24,4-29,9)	n.s.
Glucosa basal (mg/dl)	91,8 (84,6-102,6)	90 (82,8-97,2)	n.s.	91,8 (82,8-93,6)	95,4 (86,4-100,8)	0,022
Glucosa estimulada (mg/dl)	156,6(149,4 -172,8)	149,4(135 - 163,8)	n.s.	147,6(133,2 -167,4)	158,4(147,6 -169,2) ^a	n.s.
Insulina basal (mU/l)	6,6 (4,1-10,7)	10 (5,9-13,5)	0,041	10,3 ^b (9-16,4)	9,6 (7,6-11,6)	0,058
C-pèptid basal (ng/ml)	2,3 (1,9 -3,3)	2,6 (2- 3,3)	n.s.	2,8 (2,3-3,6)	2,6 (1,9-3,1)	n.s.
Insulina estimulada (mU/l)	17,5 (14,3 -25,4)	26,7 (15,5 - 38,5)	n.s.	31,1 ^b (16,2-44,8)	20,4 (17,8-30,4)	0,006
C-pèptid estimulat (ng/ml)	6,3 (5,7 - 7,5)	6,2 (5,5 - 7,1)	n.s.	7,1 (5,2-8,3)	5,9 (4,9-7,5)	n.s.
Sensibilitat HOMA (%)	57 (37 -86)	40 (29 - 63)	0,050	37 ^c (26-43)	40 (32-50)	n.s.
Funció cel·lular beta CIGMA (%)	141 (111 - 160)	147 (127 - 171)	n.s.	141 (120 - 205)	133 ^a (111 - 149)	0,033

Dades expressades com a mediana (rang intercuartil). ^a p<0,05, ^b p<0,01, ^c p<0,001

front el grup control estratificat per edat. IMC: Índex de massa corporal.

4.3.4 Taula 4. Estudi I: Secreció de proinsulina en els familiars i controls

	Controls n = 24	Familiars n = 33	p
Sexe (homes/ dones)	13/11	19/14	n.s.
Edat (anys)	38,2 (9,3)	34,5 (11,4)	n.s.
IMC (Kg/m ²)	26,9 (5)	26,3 (9,5)	n.s.
Glucosa basal (mg/dl)	91,8 (10,8)	97,2 (12,6)	0,05
Glucosa estimulada (mg/dl)	144 (36)	162 (19,8)	0,08
Proinsulina (pmol/l)	9,5 (10,5)	8,5 (7,6)	n.s.
Proinsulina estimulada (pmol/l)	22,4 (16,7)	20 (14,4)	n.s.
Proinsulina/ insulina basal	0,11 (0,08)	0,09 (0,07)	n.s.
Proinsulina/ insulina estimulada	0,11 (0,06)	0,09 (0,04)	n.s.

Dades expressades com la mitja (desviació estàndard), n.s.: $p > 0,05$. IMC: Índex de massa corporal.

4.3.5 Taula 5. Estudi I: Concentracions de proinsulina als familiars amb tolerància alterada a la glucosa per CIGMA respecte els normogluccèmics

	TNC n = 25	TAC n = 8	p
Sexe (homes/ dones)	13/12	6/2	n.s.
Edat (anys)	32,8 (9,9)	39,8 (14,7)	n.s.
IMC (Kg/m ²)	25,4 (10,3)	28,9 (5,8)	n.s.
Glucosa basal (mg/dl)	91,8 (9)	109,8 (12,6)	0,005
Glucosa estimulada (mg/dl)	154,8 (16,2)	185,4 (16,2)	0,001
Proinsulina (pmol/l)	8,8 (8,4)	7,4 (5,1)	n.s.
Proinsulina estimulada (pmol/l)	21,1 (16,2)	16,5 (6,2)	n.s.
Proinsulina/ insulina basal	0,1 (0,08)	0,07 (0,02)	n.s.
Proinsulina/ insulina estimulada	0,09 (0,04)	0,08 (0,02)	n.s.

Dades expressades com la mitja (desviació estàndard). n.s.:p>0,05. TNC: Tolerància a la glucosa normal per CIGMA, TAC: Tolerància a la glucosa alterada per CIGMA.

4.3.6 Taula 6. Estudi I: Trets de la síndrome metabòlica dels familiars en relació al grau de sensibilitat a la insulina

	Baixa n = 37	Mitja n = 49	p
Sexe (homes/ dones)	20/17	30/19	n.s.
Edat (anys)	37,7 (13)	32,7 (11,6)	0,037
IMC (Kg/m ²)	29,4 (5)	25,1 (3,3)	<0,001
Glucosa (mg/dl)	103,8 (18,4)	92,3 (10,4)	<0,001
Triglicèrids (mg/dl)	124,4 (66,5)	93,5 (45,2)	0,022
Colesterol HDL (mg/dl)	44,0 (10,7)	47,6 (13,4)	n.s.
PAS (mmHg)	128,1 (14,7)	118,2 (14,9)	0,004
PAD (mmHg)	80,1 (9,9)	74,6 (9,4)	0,011
Cintura: H>108/D>88 (cm) *	46,3	21,7	<0,001
Glucosa ≥110 (mg/dl) *	26,8	6,5	0,01
PA ≥130/80 *	45	28,3	n.s.
Triglicèrids ≥150 (mg/dl) *	24,2	11,4	n.s.
Colesterol HDL: H<40, D<50 (mg/dl) *	78,6	46,3	0,007
SM *	53,6	7,3	<0,001

Dades expressades com la mitja (desviació estàndard). IMC: Índex de massa corporal, PA: Pressió arterial, PAS: Pressió arterial sistòlica, PAD: Pressió arterial diastòlica. * Dades expressades en forma de percentatges. SM: Síndrome metabòlica segons definició de la NCEP, n.s.: p > 0,05.

4.3.7 Taula 7. Estudi II: Característiques clíniques i evolució dels pacients

	Metformina inici	Metformina 12 setmanes	Placebo inici	Placebo 12 setmanes
Sexe (homes/ dones)	5/6	-	5/7	-
Edat (anys)	46,7 ± 7,8	-	46,5 ± 6,7	-
IMC (Kg/m ²)	28,0 ± 4,5	27,7 ± 4,3	28,8 ± 4,0	28,4 ± 3,8
Circumferència cintura	95,9 ± 11,5	94,8 ± 9,4	95,5 ± 10,4	93,9 ± 10,6
Cintura / maluc	0,96 ± 0,1	0,92 ± 0,07	0,91 ± 0,07	0,92 ± 0,07
Glucosa basal (mg/dl)	110,1 ± 9,9	98,9 ± 15,7 ^a	106,9 ± 8,9	106,3 ± 6,5
Glucosa 2h TTOG (mg/dl)	162,2 ± 27,8	140,6 ± 42,9	130,3 ± 31	139,5 ± 28,9
Insulina basal (mU/l)	11,6 ± 5,4	8,8 ± 3,5 ^b	11,2 ± 3,3	11,5 ± 3,3
C-pèptid basal (ng/ml)	2,5 ± 0,7	1,8 ± 0,5 ^b	2,1 ± 0,7	2,0 ± 0,8
Glucosa estimulada (mg/dl)	190,5 ± 18,9	174,6 ± 34,5	194,8 ± 17,1	180,9 ± 13,9
Insulina estimulada (mU/l)	28,5 ± 13,5	23,3 ± 7,6	27,7 ± 11,3	31,3 ± 14,2
C-pèptid estimulat (ng/ml)	5,2 ± 1,2	4,2 ± 1,0 ^b	4,4 ± 1,4	4,5 ± 1,5
Sensibilitat HOMA (%)	37,4 ± 15,2	50,4 ± 23,2 ^b	35,4 ± 10,1	34,6 ± 9,9
Funció cel·lular beta CIGMA (%)	82,8 ± 24,0	90,9 ± 34,0	71,7 ± 27,2	83,1 ± 30,0

La glucosa, insulina i C-pèptid estimulats són després de la infusió iv de glucosa per CIGMA (veure mètodes). Les dades estan expressades com a mitjana ± DS.^a

^a p <0.01, ^b p <0.05 (intragrup)

4.3.8 Taula 8. Estudi II: Efectes de la metformina sobre la pressió arterial i el perfil lipídic

	Metformina inici	Metformina 12 setmanes	Placebo inici	Placebo 12 setmanes
Colesterol (mg/dl)	208 (54,5)	199,5 (41,9)	210 (35,4)	211,6 (34,7)
Triglicèrids (mg/dl)	101,5 (41,5)	125,6 (70,5)	107,8 (45,1)	138,8 (113,9)
Colesterol-HDL (mg/dl)	50,1 (7,6)	47,7 (11,1)	52,5 (16,1)	51,8 (11,1)
Colesterol-LDL (mg/dl)	129,3 (48,8)	123,8 (39,4)	144,6 (20,4)	135 (25,4)
PA sistòlica (mmHg)	129 (10,2)	132,7 (11,9)	131,1 (10,4)	135 (13,6)
PA diastòlica (mmHg)	74,7 (8,6)	78,6 (5,6)	71,3 (14)	76,4 (11,6)
Microalbuminúria (mg/24h)	9,4 (10,8)	15,9 (15,8)	15,7 (25,3)	11,1 (14,3)

Dades expressades com la mitja (desviació estàndard). PA: Pressió arterial.

4.3.9 Taula 9. Estudi II: Efectes antiinflamatoris de la metformina

	Metformina inici	Metformina 12 setmanes	Placebo inici	Placebo 12 setmanes
Leucòcits (K/mcL)	6,4 (1,3)	6,7 (1,6)	6,1 (1,0)	5,4 (1,1) ^a
Monòcits (K/mcL)	0,45 (0,1)	0,45 (0,1)	0,40 (0,1)	0,37 (0,1)
Neutròfils (K/mcL)	4,0 (1,1)	4,2 (1,3)	3,3 (0,7)	3,0 (0,7) ^b
Eosinòfils (K/mcL)	0,18 (0,1)	0,20 (0,1)	0,20 (0,1)	0,19 (0,1)
Linfòcits (K/mcL)	1,7 (0,5)	1,8 (0,5)	1,9 (0,4)	1,9 (0,4)
sTNFR1 (mcg/l)	2,0 ± 0,8	2,3 ± 1,2	1,7 ± 0,4	2,2 ± 1,0
sTNFR2 (mcg/l)	4,8 ± 1,7	4,4 ± 1,2	5,1 ± 1,9	4,8 ± 2,0
ALT (U/L)	28,9 (17,3)	22 (8,4) ^a	22,9 (10)	24,6 (11,4)
AST (U/L)	24,2 (4,3)	17,9 (5,4) ^b	15,5 (3,7)	16,1(1,7)
GGT (U/L)	27,1 (17,1)	19,6 (9,2)	25,4 (21,7)	20,9 (10,8)
FA (U/L)	161,6 (28,9)	156,1 (28,9)	137 (42,1)	128,9 (32)
IL-18 (ng/ml)	172,1 (33,5)	188,2 (82,9)	172 (72,8)	174,5 (85,3)
LBP (ng/ml)*	37 (25,6-60,3)	44,9 (36,6-84,7)	41,7 (29,8-82,8)	36,8 (30,4-50,4)
BPI (pg/ml)*	2,75 (1,26-7,73)	7,49 (2,56-38,8) ^a	3,24 (1,58-5,3)	2,34 (1,06-8,2)

Dades expressades com a mitjana i desviació estàndard. ^a p< 0,05 (intragrup); ^bp=0,01. *expressat com a mediana (rang intercuartil) ALT: Alanina aminotransferasa, AST: Aspartat aminotransferasa, FA: Fosfatasa alcalina, GGT: γ -glutamilttransferasa, LBP: Proteïna fixadora del LPS, BPI: Proteïna bactericida incrementadora de la permeabilitat, IL: Interleucina, sTNFR1: Fracció soluble del receptor 1 del TNF- α , sTNFR2 Fracció soluble del receptor 2 el TNF- α

5 DISCUSSIÓ

La diabetis mellitus tipus 2 s'està convertint en un dels majors problemes sanitaris del segle 21. Els canvis nutricionals i un estil de vida més sedentari han comportat un augment de l'obesitat i de la diabetis mellitus tipus 2. S'estima que al 2025 hi haurà un total de 300 milions de diabètics al món, dels quals la major part d'ells seran diabètics tipus 2 (Zimmet P, i cols., 2001). Com a conseqüència de l'augment de l'obesitat a població infantil i adolescent, s'ha produït un increment en l'aparició de diabetis tipus 2 en edats cada cop més joves (Rosenbloom AL, i cols., 1999).

La prevenció d'aquesta malaltia és un objectiu prioritari de salut pública donada la morbiditat i mortalitat prematura associada amb ella. Fins ara molts dels esforços sanitaris s'havien concentrat en prevenir les complicacions microvasculars i macrovasculars de la diabetis requerint per això un estricte control de la glucèmia i dels factors de risc cardiovasculars. L'estudi UKPDS mostrava com el tractament intensiu de la glucèmia en pacients diabètics tipus 2 disminuïa el risc de patir complicacions cròniques (UKPDS 33, 1998).

a) Estudi dels familiars dels pacients diabètics

Els familiars dels pacients diabètics, al compartir gens i també ambient comuns amb els afectats, tenen un risc superior de desenvolupar la malaltia. En el nostre primer estudi es va analitzar quins defectes metabòlics presentaven aquests subjectes. Com a grup són més hiperglucèmics, més hiperinsulinèmics, més resistents a la insulina i amb una menor capacitat cel·lular beta (Taula 1). Fonamentalment exhibeixen una resistència a la insulina i aquest fet es presenta en edats joves i no sempre relacionat amb l'obesitat. Dins d'aquest grup jove, hi ha molts diabètics en potència. La secreció d'insulina comença a minvar

probablement després, paral·lelament a l'aparició de la hiperglucèmia, salvant el biaix de que és un estudi transversal i no prospectiu (Fernández-Castañer M, i cols., 1996). Estudis longitudinals recolzen les nostres troballes (Martin BC, i cols., 1992). En el grup de més edat apareix la hiperglucèmia i la funció cel·lular beta està disminuïda. El perfil dels individus control és diferent, presenten de manera tardana i amb l'edat un pes superior i una tendència a disminuir la sensibilitat a la insulina. No presenten alteracions glucèmiques probablement perquè el seu funcionalisme beta pancreàtic és correcte. Els familiars mostren de forma prematura possiblement per motius genètics, una sensibilitat a la insulina disminuïda i posteriorment una claudicació de la secreció i l'aparició de la hiperglucèmia (Taula 3). Els resultats d'aquest primer estudi estan corroborats per múltiples treballs realitzats per diferents autors (Eriksson J, i cols., 1989; Johnston C, i cols., 1990; Laws A, i cols., 1989; Lillioja S, i cols., 1991; Osei K, i cols., 1991). En alguns estudis predomina la resistència a la insulina (Gulli G, i cols., 1992; Lillioja S, i cols., 1991) i en d'altres poblacions prediabètiques tipus 2 el defecte secretor (DeFronzo RA, 1988; Gerich JE, 1988; Porte DJ, 1992).

L'altre fet que es va observar és que els familiars més hiperglucèmics són com a grup més resistents a la insulina i tenen una funció cel·lular beta inferior al grup amb normoglucèmia (Taula 2). L'hiperglucèmia té en ella mateixa un efecte deleteri tant respecte a la secreció com a l'acció insulínica pel fenomen de la glucotoxicitat. La sensibilitat a la insulina empitjora de manera reversible davant l'hiperglucèmia. Estudis in vitro realitzats en cultius d'adipòcits que provenien de pacients amb diabetis tipus 2 mostren com la resistència a la insulina que

presenten millora posteriorment en un medi amb euglucèmia (Buren J, i cols., 2003).

Es pensava que la proinsulina podria ser un marcador de resistència a la insulina (Haffner SM, i cols., 1994 b) i de progressió de la TAG cap a la diabetis mellitus tipus 2 (Kahn SE, i cols., 1995). Aquesta hipòtesis no ha estat corroborada posteriorment per altres estudis (Hanson U, i cols., 1996; Levy JC, i cols., 1993). En el nostre treball, no es van detectar anomalies de la secreció de proinsulina en el grup de familiars estudiats ni tampoc en el subgrup més hiperglucèmic (Taula 4 i 5) (Biarnés J, i cols., 1996). Aquest fet va a favor de que l'augment de la proinsulina no és un marcador precoç sinó més aviat el resultat d'una fase més avançada d'esgotament cel·lular beta (Birkeland KI, i cols., 1994; Gelding SV, i cols., 1994; Haffner SM, i cols., 1994 a). Una limitació del nostre estudi és que l'assaig utilitzat per mesurar la proinsulina tenia reactivitat creuada amb tots els seus metabolits, pel que defectes més subtils no poden ser descartats. La major part d'autors han trobat augment de les concentracions de proinsulina en pacients amb diabetis tipus 2 severa (Porte D i Kahn SE, 1989; Saad MF, i cols., 1990) o en subjectes amb història prèvia de pancreatectomies parcials on la hiperglucèmia mantinguda ha desencadenat el buidament de grànuls immadurs (Seaquist ER, i cols., 1996).

Hem pogut comprovar com el 53,6 % dels familiars del tertíl més resistent a la insulina presenten la síndrome metabòlica respecte al grup amb sensibilitat mitja o alta que és del 7,3 % (Camps I, i cols., 1999). Aquests percentatges estan d'acord amb les troballes de McLaughlin i cols., que van trobar que només el 48 % dels individus resistents a la insulina tenen la síndrome metabòlica

(McLaughlin T, i cols., 2003). Ambdós termes no són sinònims malgrat estar relacionats. Els familiars dels pacients diabètics tenen més risc de tenir una sensibilitat a la insulina baixa i de presentar les característiques de la síndrome metabòlica que són un factor de risc per desenvolupar malaltia cardiovascular (Ford ES, 2005). Malgrat això cal no oblidar que com totes les definicions sempre són imperfectes i no engloben a tots els factors potencialment relacionats. Darrerament l'associació americana i europea de diabetis han qüestionat el fet de classificar els individus en portadors o no de la síndrome metabòlica (Kahn R, i cols., 2005).

b) Estudi doble cec de metformina front a placebo a pacients amb tolerància alterada a la glucosa

La metformina ha estat utilitzada pel tractament de la diabetis mellitus tipus 2 durant els darrers quaranta anys. La seva funció fonamental és la de millorar la sensibilitat a la insulina en el fetge, disminuint la producció hepàtica de glucosa i en menor grau augmenta la captació de glucosa a nivell muscular i teixit adipós. Estudis in vitro apunten que l'acció de la metformina deriva de l'activació de l'IRS-2 i de la cinasa hepàtica LKB1, la qual fosforilaria a l'AMPK. A nivell muscular podria activar directament a l'AMPK com s'ha demostrat en estudis in vivo (Musi N, i cols., 2002, Shaw RJ, i cols., 2005; Zhou G, i cols., 2001).

En el nostre estudi la metformina ha estat capaç de millorar la resistència a la insulina i de millorar la hiperglucèmia en aquests subjectes d'alt risc per ser diabètics (Biarnés J, i cols., 2005). L'estudi DPP va demostrar els efectes beneficiosos de la metformina alhora de reduir la incidència de diabetis en un 31

%, tot i que les modificacions de l'estil de vida foren més efectives, reduint-ho en un 58 % (Knowler WC, i cols., 2002). Altres estudis també han mostrat com la metformina disminuïa la conversió de subjectes amb TAG a diabetis respecte al placebo (Li CL i cols., 1999; Morel Y, i cols., 1999). En l'estudi DPP els efectes de la metformina van ser superiors en els subjectes obesos ($IMC > 35 \text{ kg/m}^2$); en el nostre, els pacients participants tenien un IMC per sota 35 kg/m^2 i la metformina fou metabòlicament efectiva. En el nostre estudi la metformina ha revertit la resistència a la insulina, l'hiperinsulinisme i la hiperglucèmia que presenten els pacients amb TAG. Les guies internacionals recomanen de moment i en relació als resultats del DPP, millorar els estils de vida de forma global a la població general, és a dir, modificar els hàbits dietètics i augmentar l'activitat física, per tal d'evitar l'obesitat, una de les condicions freqüentment associades a la resistència a la insulina. Es sap la dificultat de seguiment a llarg termini d'aquests programes de modificació d'hàbits i el cost i l'esforç que va representar en el DPP (Hernan WH, i cols., 2003). La introducció de fàrmacs a població d'alt risc com són els familiars de pacients diabètics tipus 2, persones obeses o amb antecedents de diabetis gestacional es podria plantejar com una segona opció quan les mesures dietètiques i d'activitat física han resultat ineficaces per millorar la TAG o l'AGB. Per altra banda, la major part de fàrmacs no queda clar si estan prevenint realment la malaltia o bé retardant-la o emmascarant-la, ja que al suspendre el tractament els seus efectes desapareixen. Calen més estudis doncs, de durada suficient i com objectiu primari la prevenció de la diabetis mellitus tipus 2 per tal de contestar a aquestes qüestions (Inzucchi SE i Sherwin RS, 2005; Padwal R, i cols., 2005).

La metformina va reduir principalment la glucèmia de dejú i en menor proporció la glucosa després del TTOG. Aquest fet reflexa probablement la seva acció fonamental millorant la resistència a la insulina a nivell hepàtic, disminuint la producció hepàtica de glucosa al inhibir la neoglucogènesi i la glucogenolisi. Podria ser que els pacients amb AGB puguin beneficiar-se més dels efectes de la metformina que els que tenen TAG. Es necessitarien més estudis a llarg termini amb un major nombre de pacients per detectar aquestes diferències.

La metformina no va modificar el perfil lipídic ni tensional dels nostres pacients. Probablement el temps de tractament és insuficient per detectar-ho. De fet, l'efecte de la metformina és molt variable entre els diferents estudis aconseguint-se només petites reduccions del 10-20 % del nivell de triglicèrids i del 5-10 % del colesterol total (Giner V i Redón J, 2004). Un metàlisi recent ha conclòs que la metformina no té un efecte intrínsec sobre la pressió arterial ni sobre les concentracions de triglicèrids i colesterol HDL i redueix de manera molt minsa el colesterol total i el colesterol LDL (Wulffele MG, i cols., 2004).

Dins dels efectes antiinflamatoris de la metformina, en primer lloc es va analitzar si hi havia variacions en el nombre de leucòcits en sang perifèrica, donat que la seva elevació s'associa a la resistència a la insulina i és predictora de diabetis mellitus tipus 2 (Schmidt MI, i cols., 1999; Nakanishi N, i cols., 2002). No es van observar canvis significatius del nombre de leucòcits després d'un tractament de 12 setmanes amb metformina, encara que és probable que sigui un temps de seguiment insuficient. Tractaments més perllongats de 6 mesos a nens resistents a la insulina si que ho han detectat (Ibáñez L, i cols., 2005).

Sabem que el TNF- α és un modulador de l'acció de la insulina i que per tant podria jugar un paper en els subjectes amb alt risc de desenvolupar diabetis. Alguns estudis realitzats a familiars de pacients diabètics tipus 2 mostren que aquests individus presenten concentracions elevades de sTNFR2 suggerint que les anomalies en les vies metabòliques del TNF- α podrien predisposar en el desenvolupament de la malaltia (Costa A, i cols., 2003); per contra, altres estudis no troben anomalies del TNF- α en les fase de TAG i si en canvi a la fase de diabetis (Muller S, i cols., 2002). No es coneixen les relacions entre la metformina i el TNF- α . Algun estudi apunta que la metformina inhibiria l'expressió hepàtica del TNF- α i que podria revertir l'efecte del TNF- α com inductor de l'esteatosi hepàtica (Lin HZ, i cols., 2000). Nosaltres no vam trobar diferències en les concentracions dels sTNFRs, és a dir que els efectes de la metformina probablement no depenen de canvis directes en la via del TNF- α , com altres estudis realitzats a pacients no diabètics havien indicat (Carlsen SM, i cols., 1998; Caballero E, i cols., 2004). La síndrome de resistència a la insulina i l'alteració de la tolerància a la glucosa comporten una resposta continua de fase aguda a través de l'alliberació de citocines procedents del teixit adipós (Fernández-Real JM i Ricart W, 1999). Si la inflamació es manté, es probable que la milloria de la resistència a la insulina per altres vies metabòliques mitjançant fàrmacs, sigui insuficient per revertir totalment aquest fenotip proinflamatori (Fernández-Real JM i Ricart W, 2003). La resistència a la insulina és probablement multifactorial, heterogènia i esdevenir per motius diferents. Hem trobat que la metformina millora la resistència a la insulina per un mecanisme independent de l'acció del TNF- α . El TNF- α disminueix la senyal del receptor d'insulina fonamentalment en el muscle esquelètic degut a la seva capacitat de fosforilar la serina de l'IRS-1

gràcies a l'activació de les cinases JNK (Fig.1) (Hotamisligil GS, 2005). En el fetge la forma predominant és l'IRS-2 i la influència del TNF- α podria ser més indirecte mitjançant la inhibició de la cascada enzimàtica postreceptor (Cheung AT, i cols., 1998). Concretament Cheung i cols., proposen que el TNF- α afavoriria l'expressió de la tirosín fosfatasa relacionada amb l'antigen leucocitari (LAR), la qual inactivaria a la cinasa d'adhesió focal (FAK) impeding l'acció de la insulina (Cheung AT, i cols., 2000).

Els subjectes tractats amb metformina varen disminuir dins el rang de la normalitat les concentracions de transaminases ALT i AST, fet que no va succeir en el grup control (Taula 9). Es controvertit l'efecte de la metformina sobre la bioquímica hepàtica. És probable que tingui efectes beneficiosos en el quadre d'esteatohepatitis hepàtica no alcohòlica (Marchesini G, i cols., 2001; Uygun A, i cols., 2004) al igual que les glitazones (Neuschwander-Tetri BA, i cols., 2003; Promrat K, i cols., 2004). Tot i que d'altres estudis només han notat canvis transitoris del perfil bioquímic hepàtic després de 3 mesos de tractament (Nair S, i cols., 2004) o bé cap canvi en el cas de diabètics tipus 2 (Tiikkainen M, i cols., 2004). En el nostre estudi, la millora de la resistència a la insulina si que s'acompanyava de reduccions significatives del perfil bioquímic hepàtic fins i tot en concentracions no suggestives d'esteatosi hepàtica, encara que no la podem descartar ja que no es van realitzar ecografies ni biòpsies hepàtiques. En canvi no vàrem observar de forma paral·lela diferències en les determinacions d' IL-18 abans i després del tractament amb metformina. Aquest fet suggereix que la millora del perfil hepàtic relacionat amb l'augment de la sensibilitat a la insulina

no sembla dependre en aquest cas de modificacions de l'IL-18, com estudis previs ens havien fet sospitar (López-Bermejo A, i cols., 2005).

La proteïna fixadora del LPS (LBP) s'associa a diferents components de la síndrome metabòlica de forma especular a la de la proteïna bactericida incrementadora de la permeabilitat (BPI). Així la LBP s'associa de forma positiva amb l'IMC i a les concentracions basals i post TTOG de glucèmia, insulina basal, HbA1c i triglicèrids. La LBP augmenta quan existeix resistència a la insulina en els subjectes amb TAG (Gubern C, i cols., 2005). En el nostre assaig amb metformina no vàrem detectar diferències significatives de la LBP malgrat si va canviar la BPI.

L'augment de la sensibilitat a la insulina es va acompanyar d'una elevació de la BPI, és a dir una millor activitat antiinflamatòria. Ambdós fenòmens doncs, la resistència a la insulina i la inflamació estan interrelacionats. Sabem que la concentració de BPI varia segons la tolerància a la glucosa, així els pacients diabètics tenen concentracions significativament més baixes respecte els subjectes normotolerants. La BPI s'associa de manera inversa als valors d'insulinèmia basals i post TTOG, glucosa basal i post TTOG i HbA1c. En els pacients amb TAG s'associa igualment de manera inversa a l'IMC i a la resistència a la insulina i de forma positiva al colesterol HDL i a les concentracions de sTNFR2 (Gubern C, i cols., 2005). La millora de l'acció insulínica està relacionada amb un millor funcionament dels neutròfils (Walrand S, i cols., 2004). Moltes de les accions dels polimorfonuclears requereixen energia i són depenents de glucosa (Furukawa S, i cols., 2000). La resistència a la insulina present en els subjectes amb TAG pot provocar una alteració del funcionament dels neutròfils provocant una disminució

de l'exocitosi de la BPI. Al no poder contrarestat la LPS circulant augmentarà la síntesi de LPB i incrementarà tota la cascada inflamatòria, la qual empitjorarà al mateix temps l'acció insulínica per un cercle viciós. Al mateix temps situacions d'inflamació aguda i sepsis generen resistència a la insulina. L'acció antiinflamatòria de la metformina podria ser per un cantó indirecta com a conseqüència de la disminució de la resistència a la insulina i el millor funcionament dels neutròfils. Però, no es pot descartar que la metformina tingui un efecte antiinflamatori directe. Així models animals de sepsis post hepatectomia sota teràpia amb metformina han observat disminucions de la resposta inflamatòria, concretament la IL-6 i l'interferó γ , encara que no es van modificar altres citocines antiinflamatòries com la IL-2 i la IL-10. Es a dir, que els efectes terapèutics de la metformina no estarien limitats únicament al tractament de la diabetis mellitus tipus 2 sinó que tindria efectes beneficiosos en altres condicions associades a la inflamació hepàtica com és la sepsis (Bergheim I, i cols., 2005).

6 CONCLUSIONS

I.- Els familiars dels pacients diabètics tipus 2:

- 1.- Manifesten resistència a la insulina.
- 2.- Tenen la funció cel·lular beta disminuïda respecte als subjectes controls fonamentalment el grup de major edat .
- 3.- Els familiars amb tolerància alterada a la glucosa presenten disminuïda la sensibilitat i la secreció d'insulina de manera més accentuada que els familiars normotolerants.
- 4.- No tenen augmentada la secreció de proinsulina
- 5.- Un 53,6 % dels familiars del tertíl més resistents a la insulina presenten la síndrome metabòlica.

II.- El tractament de 12 setmanes de metformina en els subjectes amb tolerància alterada a la glucosa determina:

a) Efectes metabòlics:

- 1.- Millora de la glucèmia en dejú i en menor grau la glucèmia post TTOG.
- 2.- Disminució de la resistència a la insulina i l'hiperinsulinisme.
- 3.- No modifica el perfil lipídic ni tensional d'aquests pacients.

b) Efectes antiinflamatoris:

- 1.- No s'ha observat modificacions del nombre de leucòcits en sang perifèrica.
- 2.- No modifica les concentracions plasmàtiques dels sTNFRs.

3.- Millora el perfil de transaminases hepàtiques: ALT i AST independentment de la IL-18.

4.- No modifica els valors de LBP.

5.- Exhibeix probablement propietats antiinflamatòries al augmentar les concentracions de BPI

7 BIBLIOGRAFIA

Abbasi F, Carantoni M, Chen YDI, Reaven GM. Further evidence for a central role of adipose tissue in the antihyperglycemic effect of metformin. *Diabetes Care* 1998; 21: 1301- 1305.

Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992; 175: 323-329 (a).

Aderka D, Engelmann H, Shemer-Avni Y, Hornik V, Galil A, Sarov B, Wallach D. Variation in serum levels of the soluble TNF receptors among healthy individuals. *Lymphokine Cytokine Res* 1992; 11: 157-159 (b).

American Diabetes Association. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.

American Diabetes Association. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160–3167.

American Diabetes Association. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2006; 29:S43-S48.

Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) *Diabet Med* 1999; 16: 442-443.

Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vols S, Tichet J, Eschwege E; D.E.S.I.R. Study Group. The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabet Metab* 2003; 29: 526- 532.

Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Pocai A, Scherer PE, Stepan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004; 303: 1195-1198.

Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, , Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; 402: 880-883.

Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, Tracy RP. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes* 2001; 50: 2384-2389.

Bauman WA, Shaw S, Jayatilleke E, Spungen AM, Herbert V. Increased intake of calcium reverses vitamin B12 malabsorption induced by metformin. *Diabetes Care* 2000; 23: 1227-1231.

Bayley CJ, Path MRC, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med* 1996; 334: 574-579.

Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 Angstrom resolution. *Science* 1997; 276: 1861-1864.

Beck-Nielsen H, Groop LC. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. *J Clin Invest* 1994; 94: 1714-1721.

Bergheim I, Luyendyk JP, Steele C, Russell GK, Guo L, Roth RA, Arteel GE. Metformin prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1053-1061.

Bhalla RC, Toth KF, Tan E, Bhatta RA, Mathias E, Sharma RV. Vascular effects of metformin. Possible mechanisms for its antihypertensive action in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. 1996; 9: 570-576.

Biarnés J, Fernández-Castañer M, Camps I, Ripollès J, Soler J. Proinsulin secretion in non diabetic first-degree relatives of NIDDM patients. *Diabetologia* 1996; 39 (suppl 1): A148.

Biarnés J, Fernández-Real JM, Fernández-Castañer M, García Maria del Mar, Soler J, Ricart W. Differential regulation of insulin action and tumor necrosis factor α system activity by metformin. *Metabolism* 2005; 54: 235- 239.

Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002; 51: 66-72.

Birkeland KI, Torjesen PA, Eriksson J, Vaaler S, Groop L. Hyperproinsulinemia of type II diabetes is not present before the development of hyperglycemia. *Diabetes Care* 1994; 17: 1307-1310.

Bjornholt JV, Erikssen G, Liestol K, Jervell J, Thaulow E, Erikssen J. Type 2 diabetes and maternal family history. *Diabetes Care* 2000; 23: 1255-1259.

Bonora E, Kiechl S, Oberhollenzer F, Egger G, Bonadonna RC, Muggeo M, Willeit J. Impaired glucose tolerance, type II diabetes mellitus and carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck Study. *Diabetologia* 2000; 43: 156-164 (a).

Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis Model Assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23: 57-63 (b).

Bosch M, Lopez-Bermejo A, Vendrell J, Musri M, Ricart W, Fernandez-Real JM. Circulating IL-18 concentration is associated with insulin sensitivity and glucose tolerance through increased fat-free mass. *Diabetologia* 2005; 48: 1841-1843.

Bratusch-Marrain PR, Komjati M, Waldhausl WK. Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type 1 diabetic humans. *Diabetes* 1986; 35: 922-926.

Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C, Tan S, Berkowitz K, Hodis HN, Azen SP. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 2002; 51: 2796- 2803.

Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, Marzocchi R, Marchesini G. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship?. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 165-173.

Buren J, Lindmark S, Renstrom F, Eriksson JW. In vitro reversal of hyperglycemia normalizes insulin action in fat cells from type 2 diabetes patients: is cellular insulin resistance caused by glucotoxicity in vivo?. *Metabolism* 2003; 52: 239-245.

Caballero AE, Delgado A, Aguilar-Salinas CA, Herrera AN, Castillo JL, Cabrera T, Gomez-Perez FJ, Rull JA. The differential effects of metformin on markers of endothelial activation and inflammation in subjects with impaired glucose

tolerance: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3943-3948.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11: 183-190.

Camps I, Biarnés J, Fernández-Real JM, Insa R, Soler J, Fernández-Castañer M. Resistencia a la insulina y síndrome metabólico en familiares de primer grado de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Med Clin (Barc)* 1999; 112: 281-284.

Carlsen SM, Waage A, Grill V, Folling I. Metformin increases circulating tumor necrosis factor- α levels in non-obese non-diabetic patients with coronary heart disease. *Cytokine* 1998; 10: 66-69.

Castell C, Tresserras R, Serra J, Goday A, Lloveras G, Salleras L. Prevalence of diabetes in Catalonia (Spain): an oral glucose tolerance test-based population study. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 43: 33-40.

Chan JC, Tomlinson B, Critchley JA, Cockram CS, Walden RJ. Metabolic and hemodynamic effects of metformin and glibenclamide in normotensive NIDDM patients. *Diabetes Care* 1993; 16: 1035-1038.

Chen KW, Boyko EJ, Bergstrom RW, Leonetti DL, Newell-Morris L, Wahl PW, Fujimoto WY. Earlier appearance of impaired insulin secretion than of visceral adiposity in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18: 747- 753.

Cheung AT, Ree D, Kolls JK, Fuselier J, Coy DH, Bryer-Ash M. An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced insulin resistance: Evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF- α . *Endocrinology* 1998; 139: 4928- 4935.

Cheung AT, Wang J, Ree D, Kolls JK, Bryer-Ash M. Tumor necrosis factor-alpha induces hepatic insulin resistance in obese Zucker (fa/fa) rats via interaction of leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase with focal adhesion kinase. *Diabetes* 2000; 49: 810-819.

Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, and the STOP-NIDDM Trial Research Group. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2072-2077.

Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, and the STOP-NIDDM Trial Research Group. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM Trial. *JAMA* 2003; 290: 486-494.

Chu NV, Kong AP, Kim DD, Armstrong D, Baxi S, Deutsch R, Caulfield M, Mudaliar SR, Reitz R, Henry RR, Reaven PD. Differential effects of metformin

and troglitazone on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25:542-549.

Costa A, Fernandez-Real JM, Vendrell J, Broch M, Casamitjana R, Ricart W, Conget I. Lower rate of tumor necrosis factor-alpha -863A allele and higher concentration of tumor necrosis factor-alpha receptor 2 in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Metabolism* 2003; 52: 1068-1071.

Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4059-4067.

Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002; 359: 995-1003.

Davies MJ, Rayman G, Gray IP, Day JL, Hales CN. Insulin deficiency and increased plasma concentration of intact and 32/33 split proinsulin in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 1993; 10: 313-320.

Davis SN, Piatti Pm, Monti L, Möller N, Ng LL, Coppack S, Antsiferov M, Brown MD, Alberti KG. A comparison of four methods for assessing in vivo B-

cell function in normal, obese, and non-insulin-dependent diabetic man. *Diab Res* 1992; 19: 107-111.

DeFronzo RA. Glucose intolerance of aging. Evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes* 1979; 28: 1095-1101.

DeFronzo RA. The triumvirate: B-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 667-687.

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia* 1992; 35: 389-397.

DeFronzo RA, Goodman AM, and the multicenter metformin study group. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 333: 541- 549.

DeFronzo RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl* 2004; 143: 9-21.

Diamanti-Kandarakis E, Spina G, Kouli C, Migdalis I. Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4666-4673.

Dominguez LJ, Davidoff AJ, Srinivas PR, Standley PR, Walsh MF, Sowers JR. Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and

intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Endocrinology* 1996; 137: 113-121.

Dowse GK, Zimmet PZ, Collins VR. Insulin levels and the natural history of glucose intolerance in Nauruans. *Diabetes* 1996; 45: 1367-1372.

Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, Hoogeveen R, Folsom AR, Heiss G; Atherosclerosis Risk in Communities Study. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2003; 52: 1799-1805.

Dunn CJ, Peters DH. Metformin. *Drugs* 1995; 49: 721-749.

Elsbach P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 14-18.

Engstrom G, Hedblad B, Eriksson KF, Janzon L, Lindgarde F. Complement C3 is a risk factor for the development of diabetes: a population-based cohort study. *Diabetes* 2005; 54:570-575.

Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1989; 321: 337-343.

Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Jaddoe VW, Osmond C, Barker DJ. Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia*. 2002; 45: 342-348.

Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di Palo C, Ciotola M, Barbieri M, Paolisso G, Giugliano D. Cytokine milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:1647 (a).

Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003; 289: 1799-1804 (b).

Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA* 2002; 285: 2846-2897.

Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 25-32.

Fernández-Castañer M, Biarnés J, Camps I, Ripollés J, Gómez N, Soler J. Beta-cell dysfunction in first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1996; 13: 953-959.

Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, Richart C. Plasma levels of the soluble fraction of Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998; 47: 1757-1762.

Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/ phenotype to thriftiness. *Diabetologia* 1999; 42: 1367–1374.

Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1154-1159.

Fernández-Real JM, Láinez B, Vendrell J, Rigla M, Castro A, Penarroja G, Broch M, Perez A, Richart C, Engel P, Ricart W. Shedding of Tumor Necrosis Factor- α Receptors, blood pressure and insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 2002; 282: E952-E959.

Fernández-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, López-Bermejo A, Ricart W. CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1780-1784.

Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocrine Reviews* 2003; 24: 278-301.

Fernández-Real JM, Biarnés J, Ricart W. Mejoría de la resistencia a la insulina con metformina: evidencias actuales. Actualización de metformina en el síndrome metabólico. *Med Clin Monogr (Barc)* 2004; 5: 7-8.

Ferrannini E. Is insulin resistance the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 2006; 38: 42-51.

Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. *Circulation* 2000; 102: 42-47.

Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM; Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51: 1131-1137.

Ford ES. The metabolic syndrome and C-reactive protein, fibrinogen, and leukocyte count: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis*. 2003; 168: 351-358.

Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005; 28: 1769-1778.

Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, Neely RD, Cobbe SM, Ford I, Isles C, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, Shepherd J, Gaw A. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001; 103: 357-362.

Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N; West of Scotland Coronary Prevention Study. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 2002; 51: 1596-1600.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307: 426–430.

Furukawa S, Saito H, Matsuda T, Inoue T, Fukatsu K, Han I, Ikeda S, Hidemura A, Muto T. Relative effects of glucose and glutamine on reactive oxygen intermediate production by neutrophils. *Shock* 2000; 13: 274-278.

Gelding SV, Nithyananthan R, Chan SP, Skinner E, Robinson S, Gray IP, Mather H, Johnston DG. Insulin sensitivity in non-diabetic relatives of patients

with non-insulin-dependent diabetes from two ethnic groups. *Clin Endocrinol* 1994; 40: 55-62.

Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schonbeck U. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med* 2002; 195: 245-257.

Gerich JE. Role of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Baillière's Clin Endocrinol Metab* 1988; 2: 307-326.

Gerich JE. Is muscle the major site of insulin resistance in type 2 (non insulin-dependent) diabetes mellitus ?. *Diabetologia* 1991; 34: 607-610.

Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab* 2003; 29: 6S28- 6S35.

Giner V, Redón J. Efectos de la metformina sobre otros factores de riesgo cardiovascular clásicos. *Med Clin Monogr (Barc)* 2004; 5: 33-41.

Giugliano D, De Rosa N, Di Maro G, Marfella R, Acampora R, Buoninconti R, D'Onofrio F. Metformin improves glucose, lipid metabolism, and reduces blood pressure in hypertensive, obese women. *Diabetes Care* 1993; 16: 1387-1390.

Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 213-224.

Groop LC, Kankuri M, Schalin-Jantti C, Ekstrand A, Nikula-Ijas P, Widen E, Kuismanen E, Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Saloranta C, Koskimies S. Association between polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328: 10-14.

Grundy SM. Metabolic Syndrome: Part I. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; 33: 267- 453.

Gubern C, López-Bermejo A, Biarnés J, Vendrell J, Ricart W, Fernández-Real JM. Natural antibiotics and insulin sensitivity: the role of Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). *Diabetes* 2006; 55: 216-224.

Guigas B, Bertrand L, Taleux N, Foretz M, Wiernsperger N, Vertommen D, Andreelli F, Viollet B, Hue L. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- β -D-Ribofuranoside and Metformin Inhibit Hepatic Glucose Phosphorylation by an AMP-Activated Protein Kinase-Independent Effect on Glucokinase Translocation *Diabetes* 2006; 55: 865-874.

Gulli G, Ferrannini E, Stern M, Haffner S, DeFronzo RA. The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents. *Diabetes* 1992; 41: 1575-1586.

Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1323-1332.

Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Increased insulin concentrations in non diabetic offspring of diabetic parents. *N Engl J Med* 1988; 319: 1297-1301.

Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. *Jama* 1990; 263: 2893-2898.

Haffner SM, Bowsher RR, Mykkänen L, Hazuda HP, Mitchell BD, Valdez RA, Gingerich R, Monterossa A, Stern P. Proinsulin and specific insulin concentration in high- and low-risk populations for NIDDM. *Diabetes* 1994; 43: 1490-1493 (a).

Haffner SM, Mykkänen L, Valdez RA, Stern MP, Holloway DL, Monterrosa A, Bowsher R. Disproportionately increased proinsulin levels are associated with the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1806-1810 (b).

Haffner S, Temprosa M, Crandall J, Fowler S, Goldberg R, Horton E, Marcovina S, Mather K, Orchard T, Ratner R, Barrett-Connor E; Diabetes Prevention Program Research Group. Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 2005; 54: 1566-1572.

Hamman RF. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1992; 8: 287-338.

Han TS, Sattar N, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Lean ME, Haffner SM. Prospective study of C-reactive protein in relation to the development of diabetes and metabolic syndrome in the Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care* 2002; 25: 2016-2021.

Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Kempf J, Zinman B, Haffner SM; insulin resistance atherosclerosis study. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2004; 53: 2623-2632.

Hanson U, Persson B, Hartling S, Binder C. Increased molar proinsulin-to-insulin ratio in women with previous gestacional diabetes does not predict later impairment of glucose tolerance. *Diabetes Care* 1996; 19: 17-20.

Häring HU, Mehnert H. Pathogenesis of type 2 (non insulin dependent) diabetes mellitus: Candidates for a signal transmitter defect causing insulin resistance of the skeletal muscle. *Diabetologia* 1993; 36: 176-182.

Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 2002; 51: 2420-2425.

He G, Pedersen SB, Bruun JM, Lihn AS, Richelsen B. Metformin, but not thiazolidinediones, inhibits plasminogen activator inhibitor-1 production in human adipose tissue in vitro. *Horm Metab Res* 2003; 35: 18-23.

Hernan WH, Brandle M, Zhang P, Williamson DF, Matulik MJ, Ratner RE, Lachin JM, Engelgau MM; Diabetes Prevention Program Research Group. Costs associated with the primary prevention of type 2 diabetes mellitus in the diabetes prevention program. *Diabetes Care* 2003; 26: 36-47.

Heymsfield SB, Segal KR, Hauptman J, Lucas CP, Boldrin MN, Rissanen A, Wilding JP, Sjostrom L. Effects of weight loss with orlistat on glucose tolerance and progression to type 2 diabetes in obese adults. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1321-1326.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336.

Hitman GA, Hawrami K, McCarthy MI, Viswanathan M, Snehalatha C, Ramachandran A, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Nissinen A, Pedersen O. Insulin receptor substrate-1 gene mutations in NIDDM; implications for the study of polygenic disease. *Diabetologia* 1995; 38: 481-486.

Hosker JP, Mathews DR, Rudenski AS, Burnett MA, Darling P, Bown EG, Turner RC. Continuous infusion of glucose with model assessment: measurement

of insulin resistance and beta cell function in man. *Diabetologia* 1985; 28: 401-411.

Hotamisligil GS. Role of Endoplasmic Reticulum Stress and c-Jun NH₂-Terminal Kinase Pathways in Inflammation and Origin of Obesity and Diabetes. *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2: S73-78.

Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 49: 2063- 2069.

Hundal RS, Inzucchi SE. Metformin: New understandings, new uses. *Drugs* 2003; 63: 1879- 1894.

Ibáñez L, Valls C, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Polycystic ovary syndrome after precocious pubarche: ontogeny of the low-birthweight effect. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55: 667- 672.

Ibáñez L, de Zegher F. Ethinylestradiol-drospirenone, flutamide-metformin, or both for adolescents and women with hyperinsulinemic hyperandrogenism: opposite effects on adipocytokines and body adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1592-1597.

Ibáñez L, Fucci A, Valls C, Ong K, Dunger D, de Zegher F. Neutrophil count in small-for-gestational age children: contrasting effects of metformin and growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3435-3439.

Ikeda T, Iwata K, Murakami H. Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 887-890.

Inzucchi SE, Sherwin RS. The prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2005; 34: 199-219.

Iozzo P, Hallsten K, Oikonen V, Virtanen KA, Parkkola R, Kemppainen J, Solin O, Lonnqvist F, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P. Effects of metformin and rosiglitazone monotherapy on insulin-mediated hepatic glucose uptake and their relation to visceral fat in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2069-2074.

Jarrett RJ, Keen H, Fuller JH, McCartney M. Worsening to diabetes in men with impaired glucose tolerance ("Borderline Diabetes). *Diabetologia* 1979; 16: 25-30.

Johnston C, Ward WK, Beard JC, McKnight B, Porte D Jr. Islet function and insulin sensitivity in the non-diabetic offspring of conjugal type 2 diabetic patients. *Diabet Med.* 1990; 7: 119-125.

Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B, Zanchetti A;

VALUE trial group. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 2004; 363: 2022-2031.

Kahn SE, Leonetti DL, Prigeon RL, Boyko EJ, Bergstrom RW, Fujimoto WY. Proinsulin as a marker for the development of NIDDM in Japanese-American men. *Diabetes* 1995; 44: 173-179.

Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003; 46: 3-19.

Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: Time for a critical appraisal. *Diabetes Care* 2005; 28: 2289-2304 (a).

Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*. 2005; 48: 1684-1699 (b).

Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V, Cauley JA, Barrett-Connor E; Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2003; 138: 1-9.

Karlsson HK, Hallsten K, Bjornholm M, Tsuchida H, Chibalin AV, Virtanen KA, Heinonen OJ, Lonnqvist F, Nuutila P, Zierath JR. Effects of metformin and rosiglitazone treatment on insulin signaling and glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Diabetes* 2005; 54: 1459-1467.

Keen H, Jarret RJ, McCartney P. The ten-year follow-up of the Bedford Survey (1962- 1972): Glucose tolerance and diabetes. *Diabetologia* 1982; 22: 73-78.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-2556.

Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: An update. *Annals of Internal Medicine* 2002; 137, 25-33.

Kitabchi AE, Tempresa M, Knowler WC, Kahn SE, Fowler SE, Haffner SM, Andres R, Saudek C, Edelstein SL, Arakaki R, Murphy MB, Shamon H; The Diabetes Prevention Program Research Group. Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin. *Diabetes* 2005; 54: 2404-2414.

Kjems LL, Roder ME, Dinesen B, Hartling SG, Jorgensen PN, Binder C. Highly sensitive enzyme immunoassay of proinsulin immunoreactivity with use of two monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1993; 39: 2146-2150.

Knobler H, Zhornicky T, Sandler A, Haran N, Ashur Y, Schattner A. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus-diabetes association. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2751–2756.

Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM and the Diabetes prevention program research group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346: 393-403.

Koster JC, Permutt MA, Nichols CG. Diabetes and Insulin Secretion: The ATP-Sensitive K⁺ Channel (KATP) Connection. *Diabetes* 2005; 54: 3065-3072.

Kuroyama H, Sanke T, Ohagi S, Furuta M, Furuta H, Nanjo K. Simple tandem repeat DNA polymorphism in the human glycogen synthase gene is associated with NIDDM in Japanese subjects. *Diabetologia* 1994; 37: 536-539.

Landin K, Tengborn L, Smith U. Treating insulin resistance in hypertension with metformin reduces both blood pressure and metabolic risk factors. *J Intern Med* 1991; 229: 181-187.

Langin D. Diabetes, insulin secretion, and the pancreatic beta-cell mitochondrion. *N Engl J Med* 2001; 345: 1772-1774.

Larsson H., Ahren B. Glucose intolerance is predicted by low insulin secretion and high glucagon secretion: outcome of a prospective study in postmenopausal Caucasian women. *Diabetologia* 2000; 43: 194-202.

Lawrence JM, Reid J, Taylor GJ, Stirling C, Reckless JP. Favorable effects of pioglitazone and metformin compared with gliclazide on lipoprotein subfractions in overweight patients with early type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 41-46.

Laws A, Stefanick ML, Reaven GM. Insulin resistance and hypertriglyceridemia in nondiabetic relatives of patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 343-347.

Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002; 37: 380-386.

Leon DD, Crutchlow MF, Ham JY, Stoffers DA. Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 845-859.

Leslie RDG, Volkman HP, Poncher M, Hanning I, Orskov H, Alberti KGMM. Metabolic abnormalities in children of non-insulin dependent diabetics. *Br Med J* 1986; 293: 840-842.

Levy JC, Rudenski A, Burnett M, Knight R, Matthews DR, Turner RC. Simple empirical assessment of beta-cell function by a constant infusion of glucose test in normal and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia* 1991; 34: 488-499.

Levy JC, Clark PM, Hales CN, Turner RC. Normal proinsulin responses to glucose in mild type II subjects with subnormal insulin response. *Diabetes* 1993; 42: 162-169.

Levy O, Canny G, Serhan CN, Colgan SP. Expression of BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) in human mucosal epithelia. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 795-800.

Li CL, Pan CY, Lu JM, Zhu Y, Wang JH, Deng XX, Xia FC, Wang H Z, Wang HY. Effect of metformin on patients with impaired glucose tolerance. *Diabetic Medicine* 1999, 16: 477-481.

Libby P. Inflammation in atherogenesis. *Nature* 2003; 420: 868-874.

Liese AD, Mayer-Davis EJ, Tyroler HA, Davis CE, Keil U, Schmidt MI, et al. Familial components of the multiple metabolic syndrome: the ARIC study. *Diabetologia* 1997; 40: 963-970.

Lillioja S, Nyomba BL, Saad MF, Ferraro R, Castillo C, Bennet P, Bogardus C. Exaggerated early release and insulin resistance in a diabetes-prone population: a

metabolic comparison of pima indians and caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 866-876.

Lillioja S, Mott DM, Sparaul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 1988-1992.

Lillioja S. Impaired glucose tolerance in Pima Indians. *Diabetic Medicine* 1996; 13: S127-S132.

Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin- deficient mice. *Nat Med* 2000; 6: 998-1003.

Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360: 57-58.

López-Bermejo A, Bosch M, Recasens M, Biarnés J, Esteve E, Casamitjana R, Vendrell J, Ricart W, Fernández-Real JM. Potential role of interleukin-18 in liver disease associated with insulin resistance. *Obes Res* 2005; (11):1925-1931.

Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature* 1994; 368: 756- 760.

Lynn S, Borthwick GM, Charnley RM, Walker M, Turnbull DM. Heteroplasmic ratio of the A3243G mitochondrial DNA mutation in single pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003; 46: 296-299.

Macfarlane WM; Frayling TM; Ellard S; Evans JC; Allen LI; Bulman MP; Ayres S; Shepherd M; Clark P; Millward A; Demaine A; Wilkin T; Docherty K; Hattersley AT. Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest* 1999; 104: R33-39.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001; 50: 2094-2099.

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002; 8: 731-737.

Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced β cell production of IL-1 β

contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002; 110: 851-860.

Mahtani MM; Widen E; Lehto M; Thomas J; McCarthy M; Brayer J; Bryant B; Chan G; Daly M; Forsblom C; Kanninen T; Kirby A; Kruglyak L; Munnelly K; Parkkonen M; Reeve-Daly MP; Weaver A; Brettin T; Duyk G; Lander ES; Groop LC. Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nat Genet* 1996; 14: 90-94.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet*. 2001; 358: 893-894.

Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 1992; 340: 925-929.

Matthews DF, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.

McLaughlin T, Abbasi F, Cheal K, Chu J, Lamendola C, Reaven G. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. *Ann Intern Med* 2003; 139: 802-809.

Metropolitan Life Assurance Co. Net weight standard for men and women. Stat Bull Metrop Life Found 1959; 40: 1-4.

Mithieux G, Guignot L, Bordet JC, Wiernsperger N. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. Diabetes 2002; 51:139-143.

Mitrakou A, Kelley D, Mokan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J. Role of suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. N Engl J Med 1992; 326: 22-29.

Modan M, Karasik A, Halkin H, Fuchs Z, Lusky A, Shitrit A, Modan B. Effect of past and concurrent body mass index on prevalence of glucose intolerance and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes and on insulin response. The Israel study of glucose intolerance, obesity and hypertension. Diabetologia 1986; 29: 82-89.

Morel Y, Golay A, Perneger T, Lehmann T, Vadas L, Pasik C, Reavens GM. Metformin treatment leads to an increase in basal, but not insulin-stimulated, glucose disposal in obese patients with impaired glucose tolerance. Diabetic Medicine 1999; 16: 650-655.

Morin-Papunen L, Rautio K, Ruukonen A, Hedberg P, Puukka M, Tapanainen JS. Metformin reduces serum C-protein levels in women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 4649- 4654.

Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia* 2002; 45: 805-812.

Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. Metformin increases AMP- activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2074-2081.

Nagi DK, Yudkin JS. Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups. *Diabetes Care* 1993; 16 :621-629.

Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 23-28.

Nakanishi N, Yoshida H, Matsuo Y, Susuki K, Tatara K. White blood-cell count and the risk of impaired fasting glucose or type II diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetologia* 2002; 45: 42-48.

National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.

Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003; 38: 1008-1017.

Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Englemann H, Zwang R, Aderka D, Holtmann H, Wallach D. Soluble forms of tumor necrosis factors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J* 1990; 9: 3269-3278.

Ohlson LO, Larsson B, Bjorntorp P, Eriksson H, Svardsudd K, Welin L, Tibblin G, Wilhelmsen L. Risk factors for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Thirteen and one-half years of follow-up of the participants in a study of Swedish men born in 1913. *Diabetologia* 1988; 31: 798-805.

Olefsky JM. The insulin receptor. A multifunctional protein. *Diabetes* 1990; 39: 1009-1016.

Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest* 1993; 92: 514-519.

O'Rahilly SP, Nugent Z, Rudenski AS, Hosker JP, Burnett MA, Darling P, Turner RC. Beta-cell dysfunction, rather than insulin sensitivity, is the primary defect in familial type 2 diabetes. *Lancet* 1986; 2: 360- 364.

O'Rahilly S, Turner RC, Mathews DR. Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1988; 318: 1225- 1230.

Osei K, Cottrell DA, Orabella MM. Insulin sensitivity, glucose effectiveness, and body fat distribution pattern in nondiabetic offspring of patients with NIDDM. *Diabetes Care* 1991; 14: 890-896.

Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000; 348: 607-614.

Padwal R, Majumdar SR, Johnson JA, Varney J, McAlister FA. A systematic review of drug therapy to delay or prevent type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 736-744.

Pan X, Li G, Hu, Y-H, Wang J, Yang W, An Z, Hu Z, Lin J, Xiao J-Z, Cao H, Liu P-A, Jiang Y, Wang J, Zheng H, Zhang H, Bennett PH, Howard BV. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: The Da Qing IGT and diabetes study. *Diabetes Care* 1997; 20: 537-544.

Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 1213-1217.

Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the third national health and nutrition examination survey, 1998-1994. *Arch Intern Med* 2003; 163: 427-436.

Patanè G, Piro S, Rabuazzo AM, Anello M, Vigneri R, Purrello F. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose. *Diabetes* 2000; 49: 735-740.

Perriello G, Misericordia P, Volpi E, Santucci A, Santucci C, Ferrannini E, Ventura MM, Santeusanio F, Brunetti P, Bolli GB. Acute antihyperglycemic mechanisms of metformin in NIDDM. *Diabetes* 1994; 43: 920-928.

Perry IJ, Wannamethee SG, Shaper AG. Prospective study of serum gamma-glutamyltransferase and risk of NIDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 732-737.

Petersen KF; Dufour S; Befroy D; Garcia R; Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 350: 664-671.

Petersen JS, DiBona GF. Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996; 27: 619-625.

Peuler JD, Miller JA, Bourghli M, Zammam HY, Soltis EE, Sowers JR. Disparate effects of antidiabetic drugs on arterial contraction. *Metabolism*. 1997; 46: 1199-1205.

Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998; 41: 1241 –1248.

Pimenta W, Mitrakou A, Jensen T, Yki-Järvinen H, Daily G, Gerich J. Insulin secretion and insulin sensitivity in people with impaired glucose tolerance. *Diabetic Medicine* 1996; 13: S33-S36.

Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Non-insulin-dependent diabetes mellitus- a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 1996; 12: 777-783.

Porte DJr, Kahn SE. Hyperproinsulinemia and amyloid in NIDDM. Clues to etiology of islet B-cell dysfunction. *Diabetes* 1989; 38: 1333-1336.

Porte DJr. Beta-cells in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1992; 40: 166-189.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327–334.

Prigeon RL, Kahn SE, Porte D Jr. Changes in insulin sensitivity, glucose effectiveness, and B-cell function in regularly exercising subjects. *Metabolism* 1995; 44: 1259-1263.

Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 188-196.

Pryor PR, Liu SCH, Clark AE, Yang J, Holman GD, Tosh D. Chronic insulin effects on insulin signalling and GLUT4 endocytosis are reversed by metformin. *Biochem* 2000; 348: 83- 91.

Pfutzner A, Pfutzner AH, Larbig M, Forst T. Role of intact proinsulin in diagnosis and treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2004; 6: 405-412.

Resnik HE. Metabolic syndrome in American Indians. *Diab Care* 2002; 25: 1246-1247.

Richardson H, Campbell SC, Smith SA, Macfarlane WM. Effects of rosiglitazone and metformin on pancreatic beta cell gene expression. *Diabetologia* 2006; 49: 685-696.

Ridderstrale M, Parikh H, Groop L. Calpain 10 and type 2 diabetes: are we getting closer to an explanation? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8:361-366.

Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14,719 initially healthy American women. *Circulation* 2003; 107: 391–397.

Roder ME, Vaag A, Hartling SG, Dinesen B, Lanng S, Beck-Nielsen H, Binder C. Proinsulin immunoreactivity in identical twins discordant for noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2359-2363.

Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 1999; 22: 345- 354.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.

Rossetti L, DeFronzo RA, Gherzi R, Stein P, Andraghetti G, Falzetti G, Shulman GI, Klein-Robbenhaar E, Cordera R. Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: in vivo and in vitro correlations. *Metabolism* 1990; 39: 425-435.

Rossi R, Origliani G, Modena MG. Transdermal 17-beta-estradiol and risk of developing type 2 diabetes in a population of healthy, nonobese postmenopausal women. *Diabetes Care* 2004; 27: 645-649.

Saad MF, Kahn SE, Nelson RG, Pettitt DJ, Knowler WC, Schwartz MW, Kowalyk S, Bennett PH, Porte Jr D. Disproportionately elevated proinsulin in Pima indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1247-1253.

Sartor G, Scherstén B, Carlström S, Melander A, Norden A, Persson G. Ten-year follow-up of subjects with impaired glucose tolerance. Prevention of diabetes by tolbutamide and diet regulation. *Diabetes* 1980; 29: 41-49.

Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003; 108: 2957–2963.

Sattar N, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Stanley A, Forrest E, Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J; west of Scotland coronary prevention study. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 2004; 53: 2855-2860.

Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J Biol Chem* 1996; 271: 5980-5983.

Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 1999; 353: 1649-1652.

Schroder J, Stuber F, Gallati H, Schade FU, Kremer B. Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection* 1995; 23: 143-148.

Seaquist ER, Kahn SE, Clark PM, Hales CN, Porte DJr, Robertson RP. Hyperproinsulinemia is associated with increased B-cell demand after hemipancreatectomy in humans. *J Clin Invest* 1996; 97: 455-460.

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005; 310: 1642-1646.

Solomon SS, Mishra SK, Cwik C, Rajanna B, Postlethwaite AE. Pioglitazone and metformin reverse insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in liver cells. *Horm Metab Res* 1997; 29: 379-382.

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003; 52: 812-817.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-312.

Strackowski M, Kowalska I, Stepień A, et al: Increased plasma-soluble tumor necrosis factor α receptor 2 level in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2002; 25: 1824-1828.

Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic Effects of Metformin in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 1995; 333: 550-554.

Swinburn BA, Metcalf PA, Ley SJ. Long-term (5 year) effects of a reduced fat diet intervention in individuals with glucose intolerance. *Diabetes Care* 2001; 24: 619-624.

Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ, Schwammenthal E, Adler Y, Goldenberg I, Leor J, Boyko V, Mandelzweig L, Behar S. Peroxisome proliferator-activated receptor ligand bezafibrate for prevention of type 2 diabetes mellitus in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2004; 109: 2197-2202.

The Decode study group. Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts. *Diabetes Care* 2003; 26: 61-69.

The Diabetes Prevention Program Research Group. Impact of Intensive Lifestyle and Metformin Therapy on Cardiovascular Disease Risk Factors in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care* 2005; 28: 888-894 .

Thorand B, Lowel H, Schneider A, Kolb H, Meisinger C, Frohlich M, Koenig W. C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984-1998. *Arch Intern Med* 2003; 163: 93-99.

Tirosch A, Shai I, Tekes-Manova D, Israeli E, Pereg D, Shochat T, Kochba I, Rudich A; Israeli Diabetes Research Group. Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men. *N Engl J Med* 2005; 353: 1454-1462.

Tsukui S, Kanda T, Nara M, Nishino M, Kondo T, Kobayashi I. Moderate-intensity regular exercise decreases serum tumor necrosis factor-alpha and HbA1c levels in healthy women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 1207-1211.

Tuomilehto J (DECODE). Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetic Association diagnostic criteria. *The Lancet* 1999; 354: 617-621.

Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M, Finnish Diabetes Prevention Study Group. Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344: 1343-1350.

Turner MD, Cassell PG, Hitman GA. Calpain-10: from genome search to function. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21: 505-514.

Turner RC, Matthews DR, Clark A, O'Rahilly S, Rudenski AS, Levy J. Pathogenesis of NIDDM- a disease of deficient insulin secretion. *Ballière's Clin Endocrinol Metab* 1988; 2: 327- 324.

Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 19-22.

UKPDS 28: a randomized trial of efficacy of early addition of metformin in sulfonylurea-treated type 2 diabetes. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes Care* 1998; 21: 87-92.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of

complications in patients with Type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-853.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. (UKPDS 34). *Lancet* 1998; 352: 854-865.

Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Yesilova Z, Gulsen M, Dagalp K. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 537-544.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389: 610-614.

Vaag A, Henriksen JE, Beck-Nielsen H. Decreased insulin activation of glycogen synthase in skeletal muscles in young nonobese caucasian first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 89: 782-788.

Vaag A, Henriksen JE, Madsbad S, Holm N, Beck-Nielsen H. Insulin secretion, insulin action, and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1995; 95: 690-698.

Valdes CT, Elking-Hirsch E. Intravenous glucose tolerance test derived insulin sensitivity changes during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 642-646.

Vestergaard H, Lund S, Larsen FS, Bjerrum OJ, Pedersen O. Glycogen synthase and phosphofructokinase protein and mRNA levels in skeletal muscle from insulin-resistant patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993; 91: 2342-2350.

Vionnet N, Bell GI. Identification of a simple tandem repeat DNA polymorphism in the human glycogen synthase gene and linkage to five markers on chromosome 19q. *Diabetes* 1993; 42: 930-932.

Vojarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1889-1895.

Waard WK, LaCava EC, Paquette TL, Beard JC, Wallum BJ, Porte DJr. Disproportionate elevation of immunoreactive proinsulin in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and experimental insulinresistance. *Diabetologia* 1987; 30: 698-702.

Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004; 27: 1487-1495 .

Walrand S, Guillet C, Boirie Y, Vasson MP. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 1104-1110.

Walston J; Silver K; Bogardus C; Knowler WC; Celi FS; Austin S; Manning B; Strosberg AD; Stern MP; Raben N, Sorkin JD, Roth J, Shuldiner AR. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med* 1995; 333: 343-347.

Warram JH, Sigal RJ, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS. Natural history of impaired glucose tolerance: Follow-up at Joslin Clinic. *Diabetic Medicine* 1996; 13: S40-S45.

Weir GC, Bonner-Weir S. Secreción de insulina en la diabetes mellitus tipo 2. *Diabetes Mellitus* 2003; 60: 739-749.

Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 785-790.

Weiss J, Olsson I. Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood* 1987; 69: 652-659.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1930-1935.

White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E413-422.

Widen E, Erikson JG, Groop L. Metformin normalizes nonoxidative glucose metabolism in insulin-resistant normoglycemic first-degree relatives of patients with NIDDM. *Diabetes* 1992; 41: 354-358.

Widen E; Lehto M; Kanninen T; Walston J; Shuldiner AR; Groop LC. Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* 1995; 333: 348-351.

Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. *Drugs* 1999; 58 (Suppl 1): 31-39.

Withers DJ; Gutierrez JS; Towery H; Burks DJ; Ren JM; Previs S; Zhang Y; Bernal D; Pons S; Shulman GI; Bonner-Weir S; White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998 ; 391: 900-904.

World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus (Department of noncommunicable disease surveillance, Geneva, 1999).

Wulffele MG, Kooy A, de Zeeuw D, Stehouwer CD, Gansevoort RT. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J Intern Med.* 2004; 256: 1-14.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288-1295.

Yusuf S, Gerstein H, Hoogwerf B, Pogue J, Bosch J, Wolfenbutter BH, Zinman B, HOPE Study Investigators. Ramipril and the development of diabetes. *JAMA* 2001; 286: 1882-1885.

Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell.* 2001; 105: 745-755.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP- activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108: 1167-1174.

Zimmet P, Alberti GMM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787.