

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DIVISION "CIENCIAS DE LA SALUD"
DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES MEDICAS
AREA DE PEDIATRIA

REGULACION GLUCEMICA Y PANCREAS
ENDOCRINO EN EL RECIEN NACIDO
NORMAL Y EN EL HIJO DE DIABETICA.
ESTUDIO FUNCIONAL Y EVOLUTIVO.

Memoria para optar al Grado de
Doctor en Medicina presentada
por Xavier Pastor Durán.

Barcelona, Abril de 1987

2.2. ADAPTACION METABOLICA DURANTE EL EMBARAZO NORMAL

2.2.1. ADAPTACION METABOLICA MATERNA

Tal como ha sido revisado en el apartado anterior, se pueden diferenciar dos fases de similar duración a lo largo del embarazo, por las tendencias metabólicas. El papel crítico depende fundamentalmente de la secreción de HCG y HCS por parte placentaria (Figura 2.5). La primera aparece en etapas muy precoces de la gestación y su función consiste en mantener el cuerpo lúteo sosteniendo e incrementando la síntesis de gestágenos. La segunda se detecta sobre la semana 20 y como se revisa a continuación es la responsable de muchos cambios que acontecen a partir de este periodo.

Durante la primera mitad del embarazo se produce un aumento rápido de la HCG. Esta aparece ya al 10º día postfecundación y alcanza un pico máximo hacia la semana 16, descendiendo posteriormente de forma rápida. Simultáneamente tiene lugar un aumento progresivo de la progesterona cuyo origen fundamental se encuentra en el cuerpo lúteo de embarazo que permanece en el ovario. A diferencia de la anterior, sus niveles se mantienen en valores máximos durante el resto de la gestación, pero su origen, a partir de la segunda mitad, es la propia placenta, pues el cuerpo lúteo se agota.

MODIFICACIONES HORMONALES DURANTE LA GESTACION

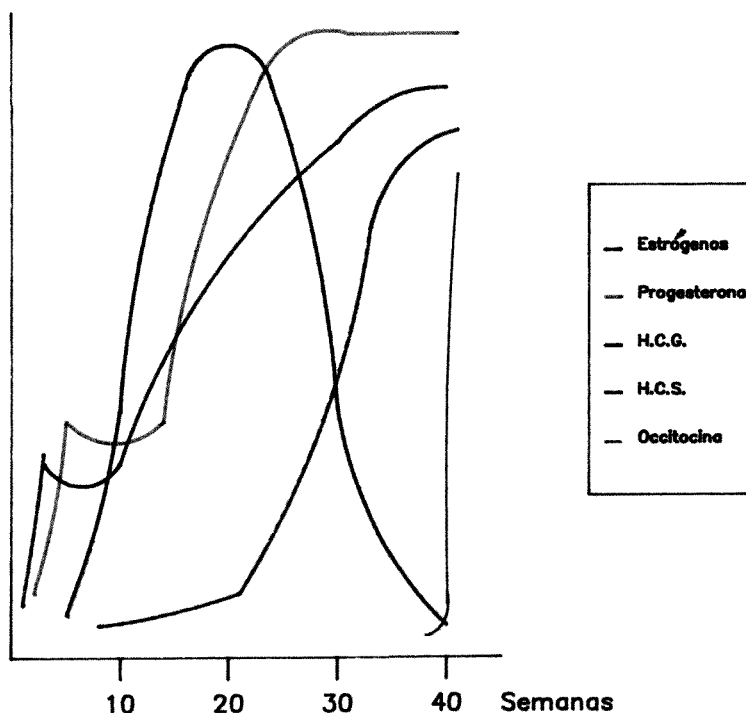


Figura 2.5.- Modificaciones metabólicas derivadas de la acción de las hormonas coriónicas.

También aumenta paralelamente aunque a un ritmo algo menor, la producción de estrógenos cuyo origen es bien diverso.

El primer efecto sobre el metabolismo energético consiste en una hiperplasia de las células de los islotes de Langerhans que afecta más intensamente a las de tipo B. Practicamente el volumen se triplica; y además aparecen cambios ultraestructurales como el "aclaramiento" de las vesículas no exento de significado puesto que en esta situación, la secreción insulínica es más efectiva. También aumenta el número de células A y PP pero en menor cuantía⁽⁵⁷⁾. Este fenómeno se atribuye a un efecto directo de los estrógenos y progestágenos sobre la proliferación celular⁽⁵⁸⁾ si bien parece necesario el concurso de otros factores como los glucocorticoides. Así pues la ratio insulina/glucagón, aumenta y se favorece una situación anabólica con tendencia a la hipoglucemia por aumento de la sensibilidad periférica e inhibición de la lipólisis, depósito de glucógeno y disminución de la neoglucogénesis hepática⁽⁷⁾.

Se ha propuesto así mismo un aumento de la sensibilidad de la célula B frente a sus secretagogos, habiendo sido demostrado en rata⁽⁵⁷⁾.

Esta situación explica algunos de los hallazgos clínicos del primer trimestre, como el aumento de apetito, las lipotimias por hipoglucemia y el incremento de peso.

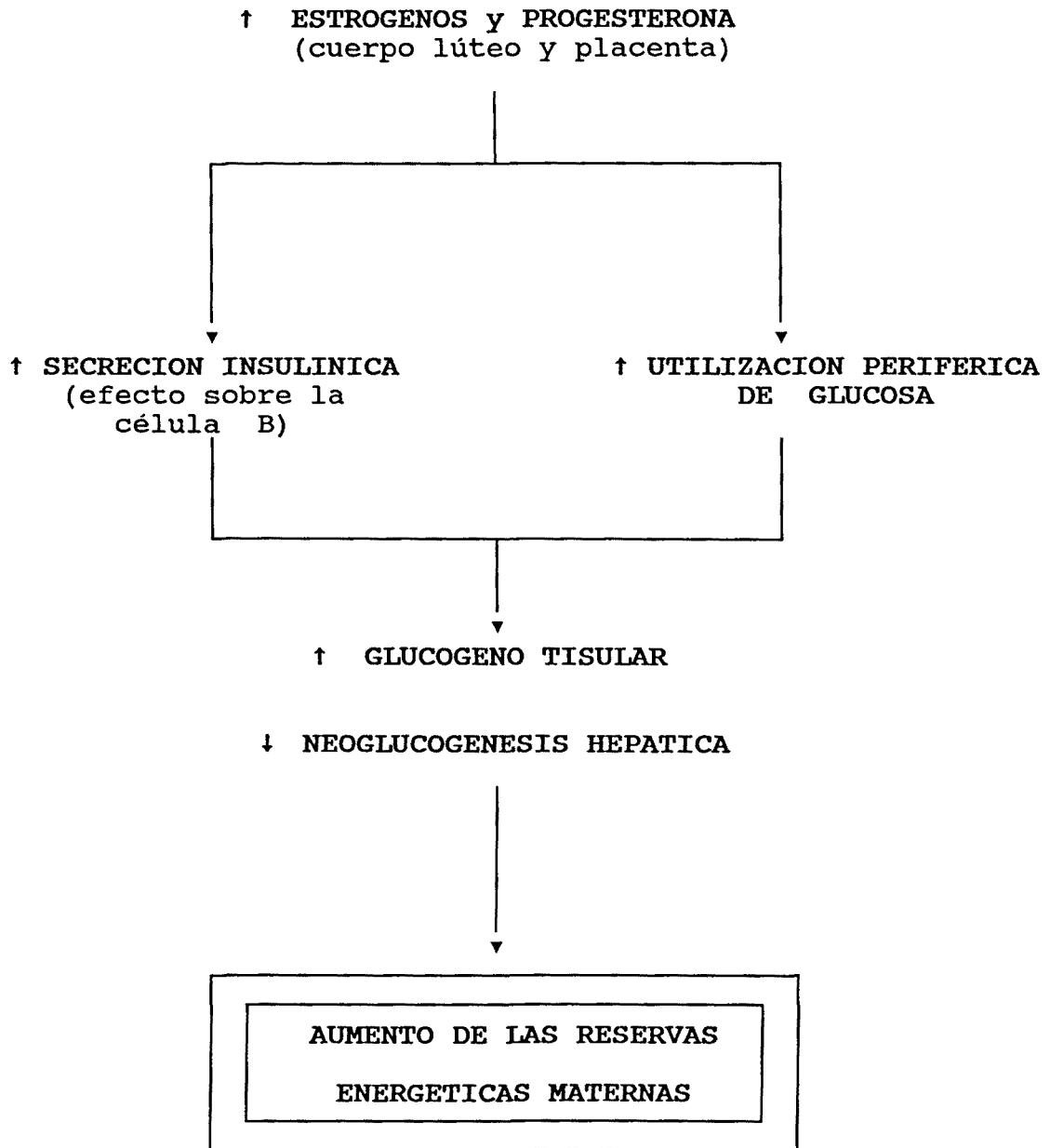


Figura 2.6.- Modificaciones metabólicas fundamentales en la primera mitad del embarazo (0-20 semanas).

Por tanto la primera mitad de la gestación es un periodo de acúmulo de reservas dada la situación hormonal y ante un embrión/feto con aun escasas -aunque crecientes- demandas metabólicas (Figura 2.6)

La segunda mitad se caracteriza por la aparición de la HCS y se mantienen los niveles elevados de estrógenos y progesterona. También se ha descrito un aumento de hormonas diabetogénicas como la prolactina^(59,60) de cortisol libre y de glucagón⁽⁷⁾ y una disminución del polipéptido gastrointestinal (GIP) que estimula la secreción de insulina⁽⁵⁸⁾. Todo ello desplaza el equilibrio hacia una situación más inestable ante cualquier variación externa, mientras que ahora sí existe un feto cuyos requerimientos nutritivos son continuos y dispone de los mecanismos bioquímicos necesarios para no encontrarse desabastecido (transporte activo, gradiente de glucosa, etc.). La situación va a depender de si la madre se encuentra en ayuno prolongado (como de hecho ocurre por la noche) o en fase postingesta.

En el primer caso, disminuye la insulina con la que desciende la ratio insulina/glucagón y se entra en una fase catabólica que se ha dado en llamar "desnutrición acelerada" de la madre, pues los fenómenos predominantes son la glucogenolisis, la neoglucogénesis⁽⁶¹⁾ y la lipólisis. Este hecho ha podido ser comprobado en el ser humano por los siguientes datos^(42,53,62) :

- Hipoglucemia materna en ayunas.
- Aumento de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres y glicerol.
- Aumento de los cuerpos cetónicos en sangre y orina.
- Disminución de los niveles plasmáticos de aminoácidos neoglucogénicos.
- El disparo neoglucogénico materno ocurre antes.

La normoglucemia no puede conseguirse por el efecto de "succión" continuo ejercido por el feto. La madre utilizará entonces los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos como sustrato energético⁽⁶³⁾. Por ello el recambio glucémico materno es muy elevado⁽⁶⁴⁾.

Tras la ingesta alimentaria se produce un aporte brusco de glucosa y aminoácidos, en un organismo con elevados niveles de hormonas diabetogénicas (HCS, glucocorticoides, prolactina, hormona de crecimiento). Esto provoca un mayor aumento de los niveles de glucemia que se mantienen elevados más tiempo que en situación basal, y obliga a una secreción de insulina superior, llegando al final de la gestación hasta a un 50-80% más de los valores pregestacionales⁽⁴¹⁾.

Esta situación de insulín-resistencia, definida como "mayores requerimientos de insulina que los habituales para mantener la euglucemia", se debe, en gran parte a

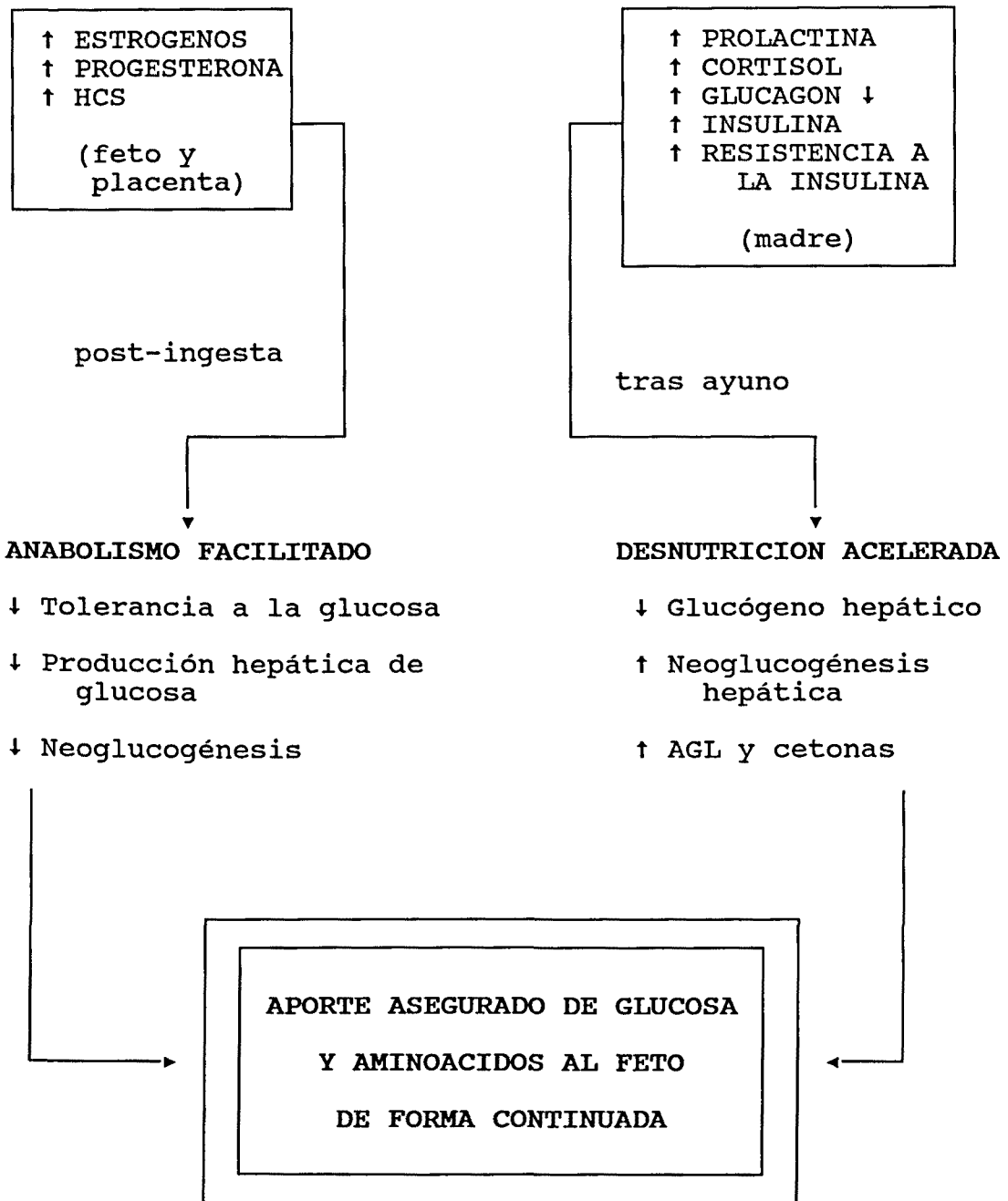


Figura 2.7.- Modificaciones metabólicas fundamentales en la segunda mitad del embarazo (20-40 semanas).

un fenómeno intracelular de causa desconocida, pues la degradación insulínica es normal, y la unión con sus receptores también^(65,66).

Se previene así el consumo materno de glucosa y el efecto anabólico de la insulina con lo que aumenta la oferta fetal⁽⁶⁴⁾. Esta adaptación fue denominada por Freinkel y colaboradores como "anabolismo facilitado" (Figura 2.7). Se crea definitivamente un ciclo metabólico oscilante materno entre ingestas y ayunas merced al cual se mantiene un aporte continuo al feto que los emplea para completar su crecimiento⁽⁶⁷⁾.

2.2.2. ADAPTACION METABOLICA FETAL

Todo el metabolismo fetal actúa en un sentido anabólico, puesto que en principio, dispone de una seguridad sobre la obtención de los principios inmediatos. Pero a la vez es un organismo en diferenciación, lo cual significa que las distintas moléculas con una importante función biológica (hormonas, receptores, enzimas, etc.) van a ir apareciendo a lo largo de este periodo.

El páncreas endocrino fetal inicia su diferenciación en periodo embrionario con la aparición a la 9ª semana de gestación de las células A productoras de glucagón. Al cabo de una o dos semanas, es posible diferenciar

la célula B responsable de la secreción insulínica y más tarde aparecen las células D y PP, secretoras en la edad adulta de somatostatina y polipéptido pancreático⁽⁵⁰⁾. Es posible diferenciar un nuevo tipo celular el D1 del que se desconoce su función.

El siguiente paso ha consistido en detectar la aparición de las hormonas pancreáticas en el feto. El glucagón ha podido ser demostrado a una edad tan precoz como a las 7 semanas de gestación^(50,68) cuando aun no es posible diferenciar morfológicamente la célula A, mientras que la insulina se puede hallar a la 10ª semana en el tejido pancreático y a la 12ª semana en el plasma fetal^(50,69). También bajo un punto de vista morfológico es posible observar diferencias. En una primera fase de la diferenciación, los islotes de Langerhans muestran una bipolarización con dos cúmulos, uno de células A y el otro de células B. A medida que el feto crece, las células B se internalizan ocupando el centro geográfico del islote, siendo rodeadas por las células A que quedan en situación periférica. La vascularización adopta una disposición irregular, con aumento marcado del retículo capilar en el centro del islote y por tanto mayor oferta de señales y respuestas mediadas por vía hematógica respecto a la célula A^(70,71).

En fases precoces la relación célula A/célula B se encuentra muy aumentada, pero a lo largo de la gesta-

ción la célula B prolifera, alcanzando una ratio a término de 1. Posteriormente en la época adulta, esta cifra se reduce a 0.25⁽⁵⁰⁾. Sin embargo la célula A alcanza su proliferación máxima sobre la semana 17, disminuyendo posteriormente⁽⁷²⁾.

Sobre la semana 22 ya existen unos islotes plenamente diferenciados de características muy similares al adulto⁽⁷³⁾.

Pero debe investigarse al mismo tiempo cuál es la maduración funcional de estas células y su grado de respuesta frente a los secretagogos específicos. Este hecho ha sido objeto de numerosos estudios en la época adulta.

La célula B tiene en la glucosa su máximo estímulo que actúa tanto sobre la biosíntesis de proinsulina a glucemias de 2-4 mmol por litro como desencadenando su secreción a concentraciones de 4-6 mmol/litro^(74,75,76,77). Aun no se ha dilucidado el mecanismo por el que la célula B reconoce a la glucosa y desencadena la secreción de insulina. Existen dos teorías al respecto⁽⁷⁸⁾. Una de ellas considera que sería el propio metabolismo de la glucosa en el interior de la célula B que desencadenaría la respuesta merced a algunos derivados intermediarios de la glucólisis (ej.: NADPH). Esta teoría denominada "me-

tabólica" se basa fundamentalmente en cuatro hechos: las hexosas y triosas metabolizables son también estímulos de la secreción insulínica a diferencia de otros hidratos de carbono no metabolizados (manosa); se ha demostrado un aumento de los intermediarios de la glucólisis en la célula B; sustancias inhibidoras del metabolismo de la glucosa (como la manohexolona y la 2-deoxiglucosa) limitan la secreción de insulina y por último la reducción de glucosa a sorbitol contribuye a la secreción de insulina.

La teoría alternativa propone la existencia de un "glucorreceptor" específico en la célula B que desencadenaría un proceso de secreción de insulina. También existen hechos experimentales a su favor como : la estimulación con metabolitos de la glucosa no activa la secreción de insulina; ha sido posible bloquear enzimáticamente la glucólisis y sin embargo se mantiene la secreción de insulina, y por último parece existir una estereoespecificidad de forma que el anómero α de la glucosa es mucho más potente que el anómero β para inducir la secreción de insulina.

La secreción de insulina es un proceso por tanto complejo que se inicia con la transcripción de un gen ubicado en el cromosoma 11 y posterior traducción, resultando una proteína de elevado peso molecular, la preproinsulina. Este precursor sufre una serie de transformaciones, postranscripcionales, principalmente de tipo hidrolí-

tico dando lugar a la molécula de proinsulina⁽⁷⁹⁾. Este proceso se inicia en el retículo endoplasmático liso y progresa hacia el aparato de Golgi, a partir del cual se forman las vesículas secretoras electrodensas, transformándose la proinsulina en insulina y C-péptido. Esta fase de biosíntesis es magnesio dependiente^(74,80).

La secreción del contenido glandular al exterior se produce por un mecanismo de emiocitosis⁽⁸¹⁾ por fusión de las membranas vesiculares con la membrana celular. Hoy en día, parece bien demostrado que la señal última consiste en un brusco incremento del calcio intracelular asociado a un aumento del AMP cíclico (que por sí solo no desencadena respuesta). Si el estímulo es agudo se produce una respuesta bifásica con un primer pico de secreción más elevado y de corta duración (fase I), seguido de una segunda onda de secreción no tan intensa pero más duradera (fase II). Se ha propuesto que la fase I representa la respuesta de insulina almacenada como tal y a punto de ser eliminada al exterior, mientras que la fase II sería la consecuencia de la síntesis *de novo* de insulina, o de la hidrólisis de proinsulina almacenada^(74,76). Sea cual sea el mecanismo de secreción insulínica, si representamos ésta como variable dependiente (y) y la glucosa como variable independiente (x) se obtiene una relación sigmoide, que indica que los mayores cambios en la secreción insulínica tienen lugar en los intervalos fisiológicos para la variación glucémica.

Otros secretagogos de la célula B reconocidos son ciertos aminoácidos como la arginina, lisina, fenilalanina y leucina^(56,76) en orden descendente. Los ácidos grasos de cadena corta y los cuerpos cetónicos parecen potenciar el efecto de la glucosa sobre la célula B, pero existe gran variabilidad entre diferentes especies y según los estados nutritivos.

La célula B se halla así mismo sometida a la regulación neurohumoral. En este sentido debe diferenciarse dos tipos de regulación hormonal :

- a) Regulación paracrina: influencia directa de los distintos tipos de células insulares entre sí (Figura 2.8). Parece ya bien demostrado el efecto del glucagón, y de la célula A favoreciendo la secreción de insulina mientras que esta última ejerce un efecto bloqueante de la célula A. Menos comprobado está el efecto de la somatostatina, aunque su administración exógena inhibe tanto la secreción de insulina como la de glucagón. Se ha propuesto que esta regulación esté mediada por señales eléctricas intercelulares mediadas por flujos iónicos a través de las uniones celulares íntimas, del tipo desmosomas o *gap-junction*, etc., no estando demostrada por el momento a través de la vía humoral.

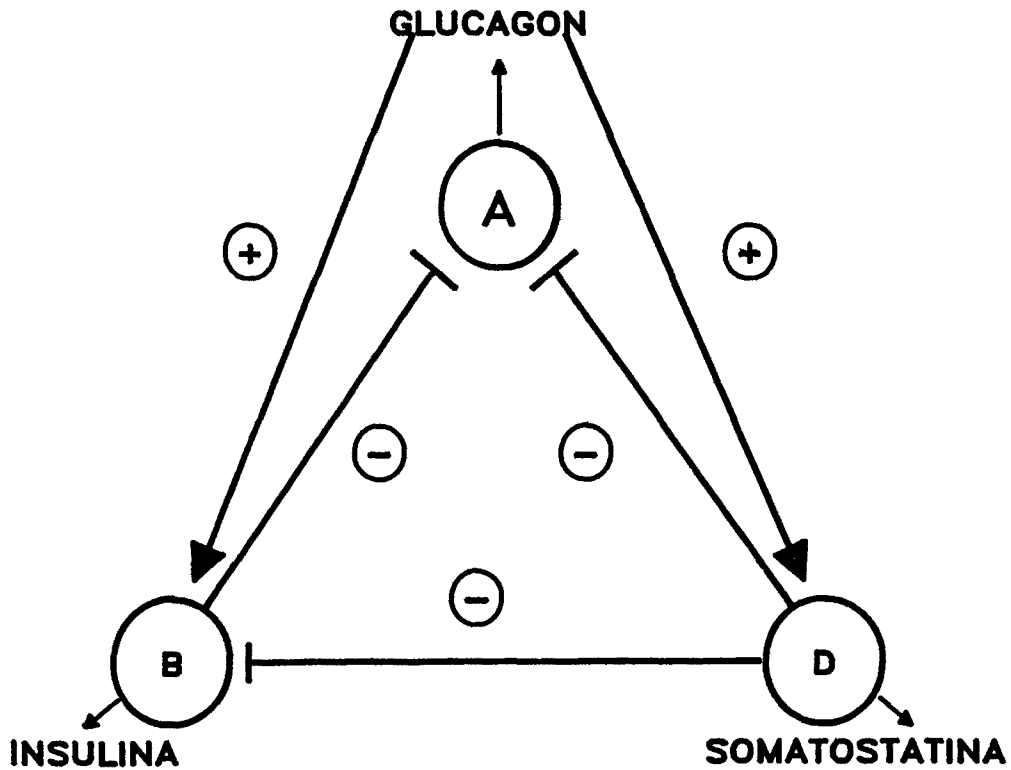


Figura 2.8.- Regulación paracrina propuesta en los islotes de Langerhans.

- b) Regulación hormonal exógena : gran número de hormonas son capaces de modular la respuesta pancreática. Un grupo importante es el formado por las hormonas gastrointestinales al estar directamente relacionadas con la alimentación y nutrición. Existe un acuerdo entre todos los investigadores que la administración exógena endovenosa de estas hormonas (secretina, pancreoci-

mina, gastrina y polipéptido inhibitorio gastrointestinal (GIP)) estimulan la secreción de insulina por parte de la célula B. La situación no es tan clara cuando se considera el papel de estas mismas hormonas cuando son endógenas es decir segregadas a la sangre desde estómago o duodeno tras la estimulación alimentaria⁽⁸²⁾. Sin embargo tras administrar glucosa oral al ser humano, puede comprobarse el aumento de GIP previo o simultáneo al de insulina. Esta sustancia parece pues ser la más firme candidato a ocupar el puesto de incretina, aunque no se descarta el papel que puedan jugar otras^(76,83,84).

Las hormonas adrenérgicas (adrenalina, noradrenalina) son unos inhibidores potentes de la secreción de insulina⁽⁷⁸⁾.

Otras hormonas que demuestran su influencia sobre la célula B son la hormona de crecimiento, la prolactina y el lactógeno placentario (HCS). Sobre la hormona de crecimiento (STH) existen ejemplos en vivo como la administración de STH a sujetos con hipopituitarismo que provoca hiperinsulinismo, o bien la administración en controles normales da lugar a un hiperinsulinismo previo a la hiperglucemia⁽⁷⁶⁾. Pero estudios *in vitro* han demostrado que tanto la STH como la prolactina y la HCS producen un aumento del contenido de insulina en islotes aisla-

dos de rata adulta en cultivo, y un incremento de su liberación al medio de incubación⁽⁸⁵⁾.

No debe olvidarse el efecto del sistema nervioso autónomo cuya terminaciones nerviosas abundan en el interior de las estructuras insulares⁽⁸²⁾.

El glucagón no es tan conocido como la insulina. Se sintetiza como proglucagón (12000 daltons) en la célula A y posteriormente es reducido a la forma definitiva de glucagón (9000 daltons). El control de su secreción en los individuos adultos tiene dos vertientes. El estímulo inhibitorio más potente es la ingestión de grandes cantidades de carbohidratos, especialmente del α -anómero, lo cual apunta nuevamente hacia la existencia de un estereoreceptor específico en la célula A⁽⁷⁶⁾. Sin embargo, en situaciones en las que existe un déficit de células B (diabetes tipo I, glucagonoma, diabetes por estreptozocina), el papel inhibidor de la glucosa no es tan evidente, lo cual sugiere que el bloqueo ante la hiperglucemia puede estar mediado en parte por la influencia paracrina de la célula B⁽⁸⁶⁾ o incluso de la célula D, pues la glucosa también estimula la secreción de somatostatina⁽⁸⁷⁾. Se conocen no obstante, bastantes estímulos secretorios para la célula A. Entre ellos tenemos la hipoglucemia aguda, la mayoría de aminoácidos, especialmente la arginina, o los niveles bajos de AGL^(76,86,88). Es interesante comprobar

el papel bivalente de los aminoácidos que estimulan tanto la insulina como el glucagón. Este fenómeno en principio paradójico, puede explicarse como un mecanismo para evitar la hipoglucemia y permitir que el efecto anabólico de la insulina se realice utilizando los aminoácidos para la síntesis proteica.

Se han propuesto también numerosas hormonas digestivas como estimulantes de la célula A, así como una influencia autonómica mediada en este caso por el parasimpático y la secreción de la acetilcolina⁽⁸⁶⁾. Pero en situaciones de *stress* agudo se ha observado un aumento de glucagón concomitante con un incremento de la actividad adrenérgica y secreción de otras sustancias como el cortisol, β -endorfina y STH.

Tras este resumen de la situación conocida hasta la fecha del funcionalismo de las células de los islotes de Langerhans, pocos datos pueden ofrecerse sobre el periodo fetal y menos aun estudios relativos al ser humano. Se han utilizado diversos modelos experimentales. *In vitro*, el método más difundido es el aislamiento y cultivo de los islotes⁽⁸⁵⁾, pero también son válidos el aislamiento y perfusión de páncreas fetal⁽⁸⁹⁾. *In vivo* se emplean comúnmente fetos de cordero, perro o macaco en su propio ambiente que se modifica a voluntad, manteniendo otros parámetros constantes^(90,91,92).

En páncreas cultivados de feto humano se ha detectado una respuesta de la célula B frente a estímulos agudos con iones y aminoácidos mientras que no existe respuesta a la hiperglucemia⁽⁵⁰⁾. En estudios que utilizan trazadores radioactivos, se ha comprobado que la incorporación del radionúcleo es superior a la proinsulina que a la insulina, aunque la secreción sólo está compuesta por ésta última⁽⁸⁹⁾. Se ha sugerido que la respuesta a la sobrecarga aguda de glucosa podría observarse a partir de la semana 28⁽⁶⁸⁾.

Sin embargo, sí que existe una respuesta pancreática a la hiperglucemia crónica, con una proporcionalidad directa de la misma con la secreción de insulina y que puede constatarse entre las 15 y 20 semanas de gestación⁽⁵⁰⁾.

Respecto al glucagón fetal se conoce que sus niveles aumentan durante todo el embarazo desde la semana 7 hasta la 40. La incubación *in vitro* ha demostrado sensibilidad de la célula A fetal a la adrenalina y a la arginina en periodos precoces entre las semanas 8 y 20. En este mismo experimento no pudo demostrarse la sensibilidad frente a la hipoglucemia. Otros estímulos importantes para la secreción de glucagón son la hipoxia y la situaciones que conducen al *stress* fetal⁽⁶⁸⁾.

Un dato interesante a tener en cuenta es la necesidad de disponer de un eje hipotálamo-hipofisario íntegro para lograr una plena maduración insular al final de la gestación. Este hecho ha podido constatarse a partir de estudios realizados en recién nacidos anencéfalos⁽⁷¹⁾.

No sería completa la descripción del panorama metabólico fetal sin una referencia al estado de los receptores de membrana para estas dos importantes hormonas. Hace ya tiempo que se conoce la necesaria existencia de un receptor específico para que transmita la acción de las hormonas polipeptídicas en sus células diana^(93,94).

Esta es una de las principales diferencias con las hormonas esteroideas. Otro problema aún más complejo es la identificación de los segundos mensajeros, o sustancias que se producen por efecto de la unión de la hormona con el receptor y son los auténticos responsables de los fenómenos bioquímicos que ocurren en el interior de la célula⁽⁹⁵⁾. Se han propuesto gran número de ellos, los nucleótidos cíclicos, el calcio, pequeños fragmentos peptídicos de la propia hormona, peróxido de hidrógeno, etc., pero hasta la fecha ninguno ha demostrado su autenticidad^(96,97,98,99,100).

Los órganos diana de la acción insulínica son el hígado, el tejido muscular y el tejido adiposo, si bien

existen receptores para la insulina así mismo en otras células y tejidos, lo cual se aprovecha para su estudio, pues es más fácil realizarlo en hematíes o monocitos^(101, 102,103).

En el feto humano se ha comprobado la presencia de receptores de insulina en el hepatocito sobre la semana 15-18 de gestación, incrementando su actividad especialmente entre las 26 y 31 semanas⁽¹⁰⁴⁾. En el tejido adiposo se han detectado sobre la semana 28 coincidiendo con el inicio de su crecimiento exponencial⁽⁶⁸⁾. No existen datos sobre el tejido muscular. La actividad de estos receptores va aumentando a lo largo de la gestación hasta llegar a ser superior a la de los sujetos adultos tal y como ha podido ser demostrado en diversos tipos de células^(104, 105,106). Otra característica diferencial con el adulto es su regulación positiva ("*up-regulation*") en contraposición al mecanismo general de regulación negativa ("*down-regulation*") en el que el número de receptores es inversamente proporcional a la concentración plasmática de la insulina. Precisamente este hecho ha sido constatado a partir de los estudios de recién nacidos hiperinsulinémicos (como los hijos de diabética) los cuales presentan un mayor número y afinidad de receptores insulínicos que los recién nacidos normales^(107,108).

El órgano diana principal del glucagón es el hígado, puesto que de él depende el mayor porcentaje de la

neoglucogénesis. Aun existe menos información al respecto ya que por su ubicación debe recurrirse siempre a modelos animales y estudios *in vitro*. En fetos de rata se ha podido detectar su existencia hacia el 20° día de gestación siendo sus niveles muy inferiores a los de las ratas recién nacidas o adultas^(68,109). Hasta cierto punto tiene su lógica puesto que el feto dispone de todos los mecanismos "protectores" que le aseguran un aporte continuo de glucosa. Su regulación es desconocida.

Por último, antes de abandonar el capítulo de la hormonología fetal, debe tenerse en cuenta la capacidad degradativa de las hormonas consideradas. Estudios realizados en fetos de cordero han podido demostrar un aumento de la semivida biológica de la insulina en plasma a 16.8 minutos, respecto su propia madre, que es de 9.3 minutos. Por lo tanto, la persistencia temporal de la insulina es casi el doble, con lo que su acción es más duradera⁽¹¹⁰⁾. Entre las explicaciones propuestas está la de un déficit metabólico hepático por inmadurez, incapaz de metabolizar la insulina, por aumento del número de receptores o por la presencia de la placenta.

Sobre el glucagón no se dispone de datos.

Tras este panorama de oferta de nutrientes y capacidad de respuesta endocrina del feto se comprende que

la glucosa sea utilizada principalmente en la obtención de energía, los aminoácidos en la síntesis proteica y los ácidos grasos se dediquen a la lipogénesis en forma de triglicéridos.

La oxidación de la glucosa es la vía quizá mejor conocida por su importancia y por su ubicuidad. De su correcto funcionamiento, que requiere fundamentalmente de un aporte adecuado de la misma y de oxígeno suficiente, con un ambiente hormonal favorable tal y como se da en el feto con un ratio insulina/glucagón elevada, depende que se utilicen los ácidos grasos y los aminoácidos para la síntesis de macromoléculas estructurales y funcionales (lipoproteínas de membrana, enzimas, etc.) así como que se almacene la glucosa sobrante en forma de glucógeno (Figura 2.9).

El rendimiento de la vía es de un 38% (alta eficacia biológica) con la obtención de 263 Kcal en forma 36 moléculas de ATP^(111,112).

La oxidación de la glucosa y el lactato por parte del feto representa aproximadamente un consumo del 65% del oxígeno fetal⁽¹¹³⁾ y la velocidad de esta reacción es proporcional a su concentración. El gasto de glucosa por parte del feto es muy elevado y está en relación directa con sus requerimientos, su valor es de 6 mg/Kg/min el triple del mismo valor en los adultos⁽⁵³⁾.

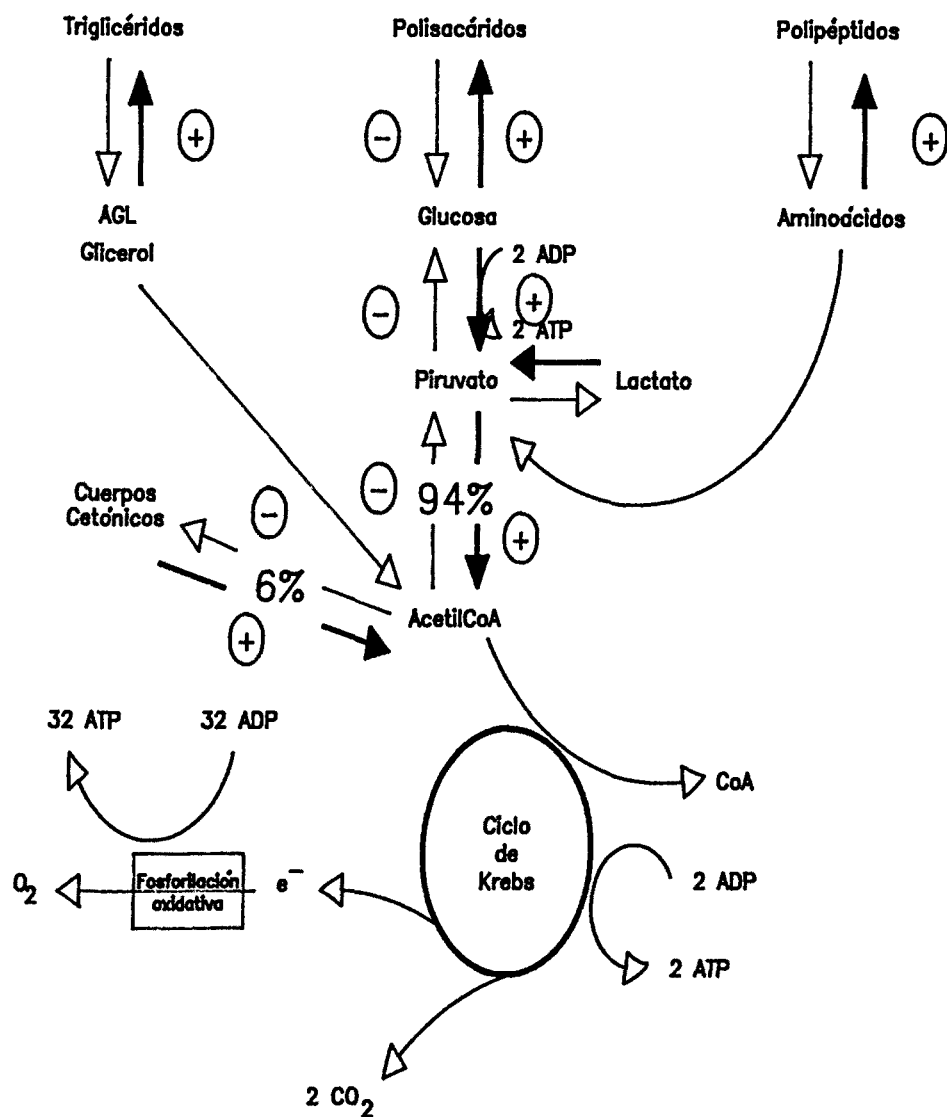


Figura 2.9.- Principales vías metabólicas funcionantes en el feto (resaltadas en color negro).

Un pequeño porcentaje de este aporte energético (6%) puede provenir en forma de cuerpos cetónicos transferidos por la madre en estado normal. De hecho se ha detectado un aumento de las actividades enzimáticas relacionadas con el catabolismo de los cuerpos cetónicos hacia el final del embarazo. Los órganos estudiados en este sentido han sido el cerebro, hígado, riñón y la propia placenta llegándose a demostrar *in vitro* la oxidación del β -hidroxibutirato^(53,114,115).

El mayor porcentaje de este aporte lo constituye la glucosa y el lactato. La glucosa proviene de la madre y el lactato en parte de la placenta y en parte como residuo catabólico de otros tejidos fetales que en el hígado, merced a un cociente de NADH/NAD^+ descendido, se oxida a piruvato y entra en el ciclo de Krebs⁽¹¹³⁾.

El acúmulo de glucógeno hepático ha podido ser demostrado ya en modelos animales a la 7ª semana de gestación, directamente relacionado con la insulina así como el depósito de los lípidos^(68,117,118).

Esto no significa que exista una incapacidad total para la activación de vías neoglucogénicas, lipolíticas o gluconeolíticas en situaciones excepcionales. En este sentido existen diversos experimentos que lo ponen de manifiesto, como es el hecho de que en ratas embarazadas

sometidas a un ayuno prolongado se desarrollan a nivel fetal una serie de cambios metabólicos acordes con una situación neoglucogénica^(45,118,119) : disminución de glucemias y de aminoácidos implicados en la formación de glucosa, aumento de cuerpos cetónicos (que podrían ser de origen materno) y aumento de la actividad de enzimas clave como la glucosa-6-fosfato, la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK), fructosa-1,6,bisfosfatasa y fosforilasas. Los mismos hallazgos con disminución del contenido de glucógeno hepático se obtienen tras la infusión de glucagón, sobre todo asociado a hidrocortisona y AMP cíclico^(68,116,120,121). Otra aproximación experimental ha consistido en provocar una reducción del 50% de la oferta de glucosa al feto a pesar de lo cual, el consumo de glucosa permanece invariable lo que sugiere la participación de glucosa de procedencia endógena^(54,122).

Se ha propuesto que en estos casos los propios cuerpos cetónicos induzcan las enzimas relacionadas con su oxidación⁽⁵³⁾.

En resumen, si todas las condiciones son favorables, se facilita el anabolismo, condición imprescindible para soportar el crecimiento, y al mismo tiempo se acumulan reservas para ser utilizadas en el periodo neonatal inmediato.

2.2.3. PAPEL DE LA INSULINA COMO FACTOR DE CRECIMIENTO

La insulina ha sido propuesta como el principal factor hormonal del crecimiento fetal^(123,124). Varios motivos apoyan esta hipótesis. En primer lugar, la insulina es una sustancia imprescindible para mantener los cultivos celulares en crecimiento; pero también existen ejemplos clínicos en el mismo sentido. Los contados casos de diabetes mellitus neonatal, publicados en la literatura, coinciden en la existencia concomitante de un marcado retraso de crecimiento intrauterino⁽⁵⁷⁾. El ejemplo contrario que corrobora este hallazgo lo tenemos precisamente en el recién nacido hijo de diabética, cuyos parámetros somatométricos, especialmente el peso, son superiores a los recién nacidos control. Estas diferencias se han relacionado con el estado de hiperinsulinismo que padecen intraútero y como respuesta pancreática fetal a las hiperglucemias de una madre no controlada. Los resultados no han sido totalmente concordantes. Ciertos autores no encuentran correlaciones claras en dicho sentido⁽¹²⁵⁾. En otros casos los estudios muestran resultados paradójicos como en el diseñado por Young y cols.⁽¹²⁶⁾ en fetos de cordero, donde demuestra una reducción de la fracción correspondiente a síntesis proteica, aunque éste podría ser un fenómeno secundario a la disminución del pool de aminoácidos libres, tanto plasmáticos como tisulares, debido a un excesivo consumo previo en sentido anabólico.

Estudios recientes *in vivo*, utilizando ratas⁽¹²⁷⁾ y fetos de primate⁽⁴¹⁰⁾ han sido más concluyentes ya que la producción de un hiperinsulinismo exógeno, mantenido y controlado ha demostrado buena correlación con los índices somatométricos neonatales^(128,129,130).

Los resultados *in vivo* pueden no ser concluyentes por varios motivos. En primer lugar no sabemos el valor promedio de la insulina. Por razones obvias las determinaciones son puntuales y reflejan únicamente una situación concreta. En segundo lugar, existen muchos otros factores que regulan el crecimiento fetal⁽¹²³⁾ (Tabla 2.1).

El glucagón no parece ejercer un efecto directo sobre el crecimiento. Algún caso descrito de déficit congénito de glucagón ha presentado un peso neonatal completamente normal. No obstante, su función debe tenerse en cuenta por regular la concentración de glucosa, sin duda el metabolito más importante bajo un punto de vista nutritivo⁽⁶⁸⁾.

Existen otros factores de crecimiento, bien expuestos en una revisión realizada por Golde⁽¹³¹⁾. En la misma se proponen dos tipos : unos con acción general o sistemática como la insulina, la hormona de crecimiento y las somatomedinas y el resto con acción específica local o

ORIGEN	TIPO	IMPORTANCIA
FETALES	Dotación genética	+++
	Metabolismo	++
	Circulación	++
	Endocrinos	
	Insulina	+++
	Somatomedinas	+
	STH	+/-
	ACTH	+/-
	Corticoides	-
	Tiroxina	+ (madurac.)
H. sexuales	+ (madurac.)	
PLACENTARIOS	Flujo sanguíneo (uterino, umbilical)	+++
	Superficie intercambio	++
	HCS (indirecto)	+
MATERNOS	Ambientales (altitud, nivel social)	+
	Hormonales	-
	Patología materna	++
	Hábitos tóxicos (droga, tabaco, alcohol, etc.)	++
	Nutrición materna	+++

Tabla 2.1.- Principales factores de crecimiento fetal.

de sistema. Entre los primeros encontraríamos el "factor de crecimiento epidérmico", el "factor de crecimiento nervioso", el "factor de crecimiento de los fibroblastos", el "factor de crecimiento derivado de las plaquetas", etc.. Los biólogos han identificado estas sustancias como moléculas muy específicas, y en escaso número, cuya acción, altamente selectiva, estriba en la activación de un tipo celular concreto desde un estado quiescente (G_0) a un estado de síntesis y división celular. Entre los factores de sistema, encontraríamos aquellos involucrados especialmente en la hematopoyesis, función que por sus características requiere un estado de recambio permanente, y entre los que encontramos la eritropoyetina, linfopoyetina y otros factores aun no bien conocidos.

En este caso conviene revisar brevemente el papel de la hormona de crecimiento (STH) y de las somatomedinas en el feto.

El primer dato en contra de que la STH intervenga en el crecimiento fetal es una observación de tipo clínico. En efecto, los pacientes afectados de déficit de dicha hormona, presentan una somatometría neonatal normal y no es hasta los dos años de edad cuando puede empezar a apreciarse un progresivo retraso de crecimiento⁽¹³²⁾. Esta observación contrasta con el hallazgo en feto humano de niveles muy elevados de STH, comparables a los de los

pacientes acromegálicos. Tras el parto sus valores descienden rápidamente en las dos primeras semanas y luego más lentamente durante el primer año de vida⁽⁵⁶⁾. La explicación a este fenómeno no está aun bien aclarada, pero a nivel teórico se pueden proponer muchas alternativas. ¿Es toda la STH medida auténtica hormona de crecimiento de origen adenohipofisario?. ¿Cómo funcionan los receptores periféricos para la STH en el feto?. ¿Cuál es el papel de las somatomedinas en este intervalo?.

Precisamente éstas últimas constituyen el tercer factor a considerar en la revisión del crecimiento fetal. La información que disponemos en este momento es abundante aunque confusa, tal como corresponde a unas hormonas de descubrimiento relativamente reciente, hace unos 10 años⁽¹³³⁾. El primer problema estriba en su nomenclatura. Somatomedina A (SMA) e IGF-I (*Insulin-Growth-Factor* tipo I) son lo mismo, mientras que el IGF-II (*Insulin-Growth-Factor* tipo II) muestra características estructurales y funcionales distintas⁽¹³⁴⁾.

Otra somatomedina descrita ha sido la B (SMB), sin embargo más que un factor de crecimiento parece estar más relacionado con los inhibidores plasmáticos de proteasas⁽¹³³⁾. Su presencia ha sido detectada en el líquido amniótico humano entre las 15 y 20 semanas de gestación, permaneciendo sus niveles invariables a lo largo del embarazo⁽¹³⁵⁾.

Características prominentes de estas sustancias son una estructura primaria muy parecida a la proinsulina y un efecto estimulante del crecimiento cartilaginoso^(136, 137). Se han descrito receptores específicos para las somatomedinas aislados en las membranas plasmáticas del hígado, células mononucleares circulantes, linfocitos en cultivo, adipocitos y placenta^(138,139) y cerebro⁽¹⁴⁰⁾. Se considera que puede existir una reacción cruzada entre las somatomedinas, la insulina y sus receptores, pero la efectividad disminuye considerablemente si la unión no es específica.

Otro dato distintivo entre la insulina y las somatomedinas consiste en su secreción y transporte. Las somatomedinas se sintetizan en el hígado; existe una fase intracelular con modificaciones postranscripcionales a partir de una preprosomatomedina, que va siendo "acortada" por procesos hidrolíticos de forma muy parecida a la insulina. Pero dos diferencias sustanciales ocurren a continuación : las somatomedinas se segregan a la sangre de forma continua y sin perder cadenas polipeptídicas y en segundo lugar discurren unidas a una proteína transportadora sintetizada por el propio hígado, por lo tanto su acción no se relaciona con variaciones bruscas de sus niveles plasmáticos (como la insulina) sino mas bien con los niveles mantenidos y la concentración de las proteínas transportadoras⁽¹³⁴⁾ que parecen ser muy específicas y que

mantendrían una función de reservorio en equilibrio entre la fracción ligada y la libre que sería en última instancia la que actuaría sobre el cartílago de crecimiento.

Se ha propuesto que la hormona de crecimiento ejerza su efecto estimulando la secreción de somatomedinas hepáticas⁽¹⁴¹⁾, pero la cuestión que nos interesa vuelve a plantearse ¿qué papel juegan las somatomedinas en el feto y recién nacido?.

Los niveles de somatomedinas en el recién nacido han mostrado una correlación con la longitud y el peso neonatal⁽¹⁴²⁾, pero esto no demuestra que las somatomedinas sean la causa del crecimiento, ya que podrían reflejar un simple proceso madurativo. Además, no todos los datos concuerdan. Los niveles neonatales representan un 50% de los valores del adulto⁽¹⁴³⁾, a pesar del elevado ritmo de crecimiento neonatal, y de haber demostrado un efecto mitogénico *in vitro* de las somatomedinas sobre células fetales en cultivo. No se ha podido demostrar el efecto contrario al no disponer de un anticuerpo antisomatomedina⁽¹³³⁾. Nuevamente otro dato clínico puede ayudar a la decisión definitiva. En el nanismo hipofisario tipo Laron existe una resistencia periférica a la acción de la hormona de crecimiento por un probable defecto del receptor específico. En consecuencia los niveles de somatomedina son muy bajos, sin embargo la somatometría de estos pacientes en el periodo neonatal es normal⁽¹⁴¹⁾.

Todos estos datos parecen pues confirmar que realmente es la insulina el principal factor hormonal del crecimiento fetal. Y si las somatomedinas tienen importancia en esta fase, quizá su regulación dependa más de la insulina y de la oferta nutritiva que de la hormona de crecimiento.

Ultimamente se han propuesto otros polipéptidos para explicar el rápido desarrollo del embrión antes de la semana 14, cuando todavía, prácticamente ni la insulina ni la somatomedina han tenido tiempo de actuar. La secreción de estos factores podría tener lugar en la placenta, lo cual le conferiría una nueva y preeminente función⁽¹⁴⁴⁾.

Sin embargo, estos estudios precisan de nuevas confirmaciones y una profundización experimental sobre el particular.

2.3. REGULACION GLUCEMICA Y PANCREAS ENDOCRINO NEONATAL

2.3.1. CRISIS METABOLICA NEONATAL TRAS EL PARTO

Eminentes autores consideran el nacimiento como un "trauma" para el recién nacido. Quizá el más representativo sea Sigmund Freud, lo cual le dio pie a proponer psicopatías variadas con este origen común. También se ha dicho que el parto acaba con la primera etapa del ser humano, quizá "la más feliz" de todas ellas. Consideraciones subjetivas aparte, bajo un punto de vista fisiopatológico, es cierto que existe una "crisis" y además "aguda", a la que el feto debe adaptarse, pues de lo contrario no es posible su supervivencia. Para realizar una buena hematosis debe expandir sus pulmones e iniciar el ciclo respiratorio de forma ininterrumpida, secundariamente se produce una readaptación cardiovascular, en sentido opuesto al que existía intraútero. Debe iniciar de inmediato una termorregulación puesto que bruscamente la temperatura ambiente desciende de 15 a 20 °C. Y por último el cuarto componente de esta nueva situación es la obtención de la energía necesaria para mantener todo el metabolismo que alimenta a estas funciones⁽¹⁴⁵⁾. Hasta la ligadura del cordón umbilical, el feto recibía un aporte

continuo y asegurado de oxígeno y nutrientes; tras la sección del mismo, la dependencia del medio ambiente es total. Empieza la dimensión social del nuevo ser cuyo interlocutor principal va a ser la propia madre durante los primeros años de vida. En el mejor de los casos el primer aporte nutritivo exógeno se produce a las 6 horas de vida, y por lo que respecta a la lactancia materna no suele ser efectiva hasta las 12-24 horas tras el parto, cuando tiene lugar la "subida de la leche".

Por lo tanto durante este periodo crítico de transición que suele acotarse a las 12 primeras horas de vida se debe obtener la energía a partir de los sustratos acumulados por el feto durante el tercer trimestre de la gestación.

2.3.2. ADAPTACION METABOLICA

La posibilidad de superar la "crisis metabólica" y adaptarse a la nueva situación vendrá condicionada fundamentalmente por la existencia de los siguientes apartados⁽⁷³⁾.

- 1º. Cantidad suficiente de reservas energéticas disponibles.
- 2º. Activación de las hormonas de contrarregulación que se

opongan al efecto insulínico predominante hasta ese momento.

- 3°. Existencia y disponibilidad de los receptores de membrana, intermediarios indispensables de la acción hormonal.
- 4°. Existencia de un microambiente celular adecuado para que puedan desarrollarse los fenómenos desencadenados por la acción de las hormonas de contrarregulación.
- 5°. Aporte exógeno asegurado de nutrientes al recién nacido.

Es un hecho comprobado en todas las especies de mamíferos, que la glucemia neonatal sufre un descenso importante durante las dos primeras horas de vida^(73,145). En el recién nacido humano se acepta como normal que la glucemia descienda desde valores de 70-80 mg/dl (70-80% de los valores maternos) hasta cifras de 40 mg/dl⁽¹⁴⁶⁾ lo que ya no es tan universal es la forma de revertir esta situación. En general existen dos modelos animales bien estudiados, las ratas y los corderos, que presentan un comportamiento bien distinto cuando se revisa la literatura. Posiblemente ello obedece a diferencias evolutivas que se manifiestan ya en el primer apartado de las cinco condiciones expuestas anteriormente. Así, el feto rata nace con

un abundante depósito de grasa, con lo cual se aproxima más al modelo humano, mientras que el cordero, nace depleccionado en este sentido. Como es lógico, al intentar profundizar los conocimientos, perdemos información sobre el ser humano y debemos inferirla de los estudios animales, sin embargo, como todo en biología, no se puede ser rígido pues, según palabras de Claude Bernard, "la más pequeña de las células puede convertirse en el mayor de los herejes"⁽¹⁴⁷⁾.

El recién nacido humano a término posee unas reservas de glucógeno de 100-150 mg/gr de tejido, lo cual representa el doble de un adulto normal^(145,148). El *locus* preferente de este acúmulo es el hígado, seguido a distancia por el tejido muscular (esquelético y cardíaco).

También el recién nacido humano a término presenta de un 14 a 16% de grasa corporal, útil para ser transformada en ácidos grasos libres y glicerol.

Por otra parte tenemos un alto requerimiento de glucosa por parte del SNC que se cifra como promedio de 6 mg/Kg/min^(149,150). Representa también un valor casi triple al del adulto, con el agravante de que su extracción del plasma a nivel cerebral es independiente de su concentración plasmática⁽¹⁴⁸⁾ y su falta, sólo puede ser paliada de forma provisional, transitoria y parcial por el

lactato, los cuerpos cetónicos o el glicerol⁽¹¹³⁾. Es bien conocido que existe una muy buena correlación entre el tamaño relativo del cerebro con respecto al resto del cuerpo y la producción endógena de glucosa ($r=0.94$)⁽¹⁵¹⁾. La hipótesis actualmente aceptada consiste en la existencia de un aumento del glucagón concomitantemente con la hipoglucemia, lo cual disminuiría la ratio insulina/glucagón favoreciendo fundamentalmente el catabolismo del glucógeno. El glucógeno muscular sería consumido en el mismo tejido, liberando lactato al torrente circulatorio que serviría como sustrato metabólico a través de la vía de Cori. El glucógeno hepático tendría tendencia a la glucogenolisis por el bloqueo de la glucógeno sintetasa y pasaría a la sangre en forma de glucosa donde serviría de aporte fundamentalmente al cerebro, puesto que el tejido muscular ya está cubierto con sus propias reservas. Al mismo tiempo se iniciaría la lipólisis, proceso algo más lento pero que se detecta antes de la 6 horas de vida, demostrado indirectamente por la reducción del cociente respiratorio de 1 a 0.8⁽¹⁵²⁾.

El aumento de glucagón ha sido bien documentado y de hecho el páncreas neonatal se halla preparado para esta respuesta tanto desde un punto de vista de diferenciación morfológica⁽¹⁵³⁾ como funcional^(150, 154, 155). Quizá los receptores del glucagón juegen también un papel importante desarrollándose de forma rápida en este periodo

y permitiendo el segundo paso clave para combatir la hipoglucemia a medio plazo que va a ser la activación de la gluconeogénesis. A pesar del aumento de los depósitos de glucógeno, éstos no son permanentes y solucionan la fase de emergencia de la hipoglucemia, pero para mantener una elevada producción endógena de glucosa a la espera de recibir el aporte exógeno, es necesario obtener glucosa *de novo* a partir del lactato y de los aminoácidos principalmente, juntamente con el ahorro que supone la utilización del glicerol y de los cuerpos cetónicos como recurso energético adicional⁽¹⁵⁶⁾. La base para el desarrollo de la neoglucogénesis, estriba en el aumento de actividad de las enzimas clave que controlan los pasos irreversibles (por tanto limitantes) de este proceso. Una de ellas es quizá la mejor estudiada debido a su importancia. Se trata de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) que de unos valores mínimos antes del parto se incrementa hasta alcanzar las cifras propias del adulto a las 24 horas de vida. Es conocido por estudios en rata recién nacida que este incremento viene facilitado por un aumento del AMPc intracelular, y parece responder a una síntesis *de novo* puesto que no se han podido detectar precursor alguno⁽¹⁴⁵⁾. También se ha propuesto recientemente que el AMPc aumenta considerablemente la semivida del RNA mensajero específico para la PEPCK. A este nivel de suposiciones nos hemos de basar en los estudios experimentales realizados en animales. Entre ellos caben destacar los realizados por Cuezva

y cols.^(157,158) que demuestran un aumento de las *ratios* ATP/ADP y NAD^+/NADH durante las 6 primeras horas de vida. Ambas situaciones es sabido que favorecen el desarrollo de la neoglucogénesis.

Evolutivamente se conoce que la glucemia basal va aumentando, llegando a normalizarse entre el tercer y cuarto días de vida⁽¹⁵⁶⁾. Es interesante recordar que precisamente por estas fechas se alcanza el peso mínimo postnatal y se inicia la recuperación del mismo, fenómeno que será ya progresivo y definitivo de no existir causas exógenas que lo alteren.

En esta segunda fase ya existe una alimentación exógena oscilante y entran en juego otra serie de hormonas cuyo origen es el tubo digestivo. Recientes estudios en este sentido^(159,160) realizados en recién nacidos humanos a término demuestran un incremento del 400% de la concentración de gastrina, un aumento del 300% en la concentración de enteroglucagón y 200% de PP tras la administración de leche materna, al 6º día de vida; no antes. El entero-glucagón y la gastrina poseen una acción trófica sobre la mucosa gástrica lo cual podría relacionarse con el importante crecimiento del tubo digestivo en este periodo. Otras hormonas intestinales como el GIP (polipéptido gastrointestinal), la motilina y la neurotensina aumentan posteriormente hacia los 15 días de vida. El GIP tiene

interés pues forma parte del eje entero-insular y como ya fue comentado en el apartado 2.2.2 estimula la secreción de la célula B pancreática.

Otras hormonas varían considerablemente en este periodo. La revisión de Kovar y Harvey⁽¹⁵⁴⁾ es muy completa bajo un punto de vista descriptivo. Resulta que tras el parto también aumentan la STH, la ACTH, la prolactina, la TSH, la calcitonina⁽¹⁶¹⁾, la ADH, la aldosterona y las catecolaminas. Precisamente estas últimas han sido, y todavía lo son, objeto de polémica, puesto que si bien, sus concentraciones son muy altas en sangre de cordón, inmediatamente descienden tras el parto, con lo cual no parece que jueguen un papel importante en la contrarregulación, a no ser que estimulen la secreción de glucagón. Su aumento durante el parto se relaciona con la situación de hipoxia y *stress* del mismo.

2.4. GESTACION DIABETICA

2.4.1. TRASTORNOS ADAPTATIVOS DURANTE EL EMBARAZO EN LA GESTACION DIABETICA

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica con repercusión sistémica y cuya característica principal consiste en una hiperglucemia por incapacidad de distribuir correctamente las moléculas de glucosa. El origen de este trastorno es muy diverso, pero suele existir un trasfondo hormonal en el que está implicada la insulina y su receptor^(4,162,163,164). A continuación revisaremos brevemente las clasificaciones propuestas bajo un punto de vista dirigido al problema que nos ocupa.

2.4.1.1. Clasificaciones propuestas.

A grandes rasgos se han diferenciado dos grandes grupos de diabetes mellitus que pueden presentarse durante la gestación :

- a) Diabetes gestacional : es aquella diabetes mellitus inducida por el embarazo, diagnosticada durante el mismo y que desaparece tras el parto.

- b) Diabetes insulino dependiente : es aquella diabetes mellitus que requiere la administración de insulina exógena para su control.

Sin embargo analizando la bibliografía reciente sobre los avances producidos en el conocimiento de la fisiopatología de la diabetes mellitus, aparece un panorama más complejo que conviene conocer.

Una de las primeras clasificaciones propuestas fue la de P. White en 1949⁽¹⁶⁰⁾ y ampliada en 1965⁽¹³⁾ tras un exhaustivo estudio de 1587 pacientes estudiados en la prestigiosa clínica Joslin dedicada por completo al estudio y tratamiento de pacientes diabéticos. Esencialmente se subdivide a las gestantes en varias categorías, la primera de las cuales (A), corresponde a la diabetes gestacional y el resto (B, C, D, E, F y R) son diabetes mellitus insulino dependientes en las que fundamentalmente se valora la antigüedad de la enfermedad y las complicaciones derivadas de la vasculopatía manifiesta en la retina o a nivel renal (Apartado 3.1.3).

Esta clasificación ya fue revisada por Pedersen y colaboradores⁽¹⁶⁶⁾ que aducían la escasa utilidad pronóstica de la misma. Estos autores incluyeron la consideración de algunos factores de riesgo fetal elevado como eran la pielonefritis aguda, hipertensión arterial o

toxemia, la mala adecuación de los pacientes al control médico y los diagnósticos tardíos.

En 1979 la comisión denominada "*National Diabetes Data Group*" del National Institute of Health (U.S.A.), propuso una nueva clasificación atendiendo más a las características clínicas y terapéuticas diferenciales de la diabetes mellitus. Aquí se consideraban tres grupos distintos^(58,167).

- a) Tipo I : Comprende a la diabetes mellitus "juvenil" o insulino dependiente , cuya fisiopatología estriba en la ausencia de secreción insulínica endógena por fallo de la célula beta pancreática. La descompensación tiende a la cetosis y es obligada la terapia insulínica de por vida.

- b) Tipo II : Corresponde a la diabetes mellitus tipo "adulto". No suele desembocar en cetoacidosis, aparece en adultos de edad media y se asocia generalmente a obesidad. El mecanismo fisiopatológico es debido en gran parte a una resistencia periférica a la acción insulínica coexistiendo en muchos casos con hiperinsulinemia. En situaciones de *stress*, como el embarazo, precisa el aporte exógeno de insulina indefectiblemente.

- c) Gestacional : Es aquella diabetes mellitus que aparece o se diagnostica durante el embarazo y que puede desaparecer tras el parto aunque puede recurrir para dar paso a una diabetes tipo II hasta en un 50% de casos⁽¹⁶⁸⁾. Se diagnostica necesariamente por la práctica de una sobrecarga oral con 100 g de glucosa debiendo presentar como mínimo dos valores de hiperglucemia patológicos a lo largo de las 3 horas que dura la prueba. La dieta suele ser suficiente para controlar la hiperglucemia.

Sin embargo ha sido en este último grupo donde ultimamente se señala una gran heterogeneidad, tanto en su etiología como fisiopatología^(169,170). Por ello, basados en dichos estudios se ha propuesto una nueva subclasificación de la diabetes gestacional.

- a) Clase A1 : Aquellas diabéticas gestacionales cuya glucemia basal no supere los 105 mg/dl.
- b) Clase A2 : Recoge a las diabéticas gestacionales con glucemias basales entre 105 y 130 mg/dl.
- c) Clase B1 : Agrupa a las diabéticas gestacionales cuya glucemia basal supere 130 mg/dl.

2.4.1.2. Cambios metabólicos en la gestación diabética

Ya se han comentado en el apartado 2.2.1 los cambios metabólicos que tienen lugar en la gestación normal y que a partir de la segunda mitad adoptan un cariz diabetogénico. A la hiperglucemia, que es constante y define la enfermedad, se añaden en estado basal otros trastornos bioquímicos tales como un aumento de los ácidos grasos libres, triglicéridos y lipoproteínas, especialmente en el tipo II y la diabetes gestacional⁽⁵⁷⁾, o la cetosis en la diabetes tipo I^(53,171), expresión de la lipólisis compensadora.

Sin embargo las alteraciones son más evidentes cuando se considera la respuesta a la ingesta alimentaria. Tras una sobrecarga brusca como puede ser una comida, se produce una hiperglucemia aguda bien por déficit absoluto de insulina (tipo I) o por una respuesta lenta, tardía e incompleta de la célula beta (tipo II o diabetes gestacional)^(37,170), asociada a otros fenómenos como una resistencia periférica⁽¹⁷²⁾ por disminución del número de receptores⁽¹⁷⁴⁾, un efecto más distal a nivel postreceptor⁽¹⁷⁵⁾ o incluso por alteración del acoplamiento entre las subunidades receptora y efectora del receptor⁽¹⁷⁶⁾, y también se ha propuesto una disminución del efecto incretina⁽¹⁷³⁾.

En las diabetes tipo I se asocia la tendencia a la hipoglucemia en el primer trimestre del embarazo, secundaria al estímulo ejercido por los estrógenos sobre la célula beta. Si existe un cierto grado de reserva pancreática, se pueden sumar los efectos.

En definitiva lo que ocurre es una oscilación glucémica brusca y de mucha mayor amplitud que en la gestación normal⁽¹⁷⁷⁾.

2.4.2. REPERCUSIONES FETALES DE LA GESTACION DIABETICA

Ya hace un siglo, en 1882 un obstetra inglés, J. Matthews Duncan, publicaba un artículo en la revista *Transactions of the Obstetrical Society of London*⁽¹⁷⁸⁾ donde definía un grupo de gestantes que "desarrollaban una diabetes durante su embarazo que tras el parto desaparecía"; además comentaba : "muchos de sus recién nacidos son enormes (macrosomas) y en ocasiones fallecen inexplicablemente a las pocas horas de haber nacido". Tres años más tarde otro obstetra francés, Lecorché⁽¹⁷⁹⁾, comunicaba los mismos hallazgos en los *Annales de Gynecologie* de París y describía la presencia de malformaciones congénitas en dos de los cuatro niños descritos. Desde entonces se han ido

comunicando nuevos casos y se ha delimitado una serie de problemas patológicos, hasta cierto punto "característicos" del hijo de madre diabética, llegando a adquirir suficiente entidad como para que en 1975, G.B. Avery⁽¹⁸⁰⁾ le dedicara un capítulo entero en la primera edición de su tratado de Neonatología. Estas alteraciones tienen su origen en el desarreglo metabólico que se desarrolla en el embarazo y que se comenta a continuación.

2.4.2.1. Excesivo aporte de nutrientes al feto

Atendiendo a las características del transporte placentario son fundamentalmente tres los metabolitos que al estar elevados en el torrente sanguíneo materno, se verán asimismo incrementados en el compartimento fetal. Estos son la glucosa, -sin lugar a dudas el más importante-, los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos. El resto de nutrientes, al ser transferidos por mecanismos de transporte activo no tienen tanta importancia. El primero es un estimulador positivo de la síntesis y secreción de insulina, y los dos restantes potencian la acción de la glucosa⁽¹⁸¹⁾, por lo cual no es de extrañar que en 1954 Pedersen y cols.⁽¹⁸²⁾ propusieran la hipótesis del binomio hiperglucemia-hiperinsulinismo, ya que se daban todas las condiciones favorables al desarrollo de las vías anabólicas.

Es por ello que se ha invocado esta situación como la causa de la macrosomía fetal de gran parte de estos recién nacidos, ya que se ha comprobado una hipertrofia de aquellos tejidos sensibles a la acción de la insulina (tejido muscular, adiposo, hígado, etc.) y no de otros que como el cerebro son independientes de la acción hormonal para obtener la glucosa^(183,184). A parte del dato clínico disponemos de numerosos estudios que demuestran una clara correlación entre la glucemia materna y la glucemia y C-péptido del líquido amniótico cuyo origen es claramente fetal^(185,186,187,188,189,190).

Otro hecho que se relaciona con las oscilaciones bruscas de glucemia en el primer trimestre son las malformaciones congénitas, auténtica embriopatía que se presenta con una frecuencia tres veces superior a la población normal. Ya hemos visto como en nuestra muestra se sitúa en un 9.8% del total, lo cual coincide con las diversas estadísticas comunicadas que aceptan un rango de 7 a 10%^(31,191). Más importante se torna el problema cuando se conoce la gravedad de las mismas (Figura 2.10), ya que suelen ser complejas a nivel del neuroeje (hidrocefalias, mielomeningocele, anencefalia), cardíacas (situs inversus, defectos septales, transposición de grandes vasos, etc.), renales (hipospadias, estenosis pieloureteral, etc.) o asociaciones, como el síndrome de regresión caudal que se manifiesta en grado variable, desde la ausencia de sacro

Malformaciones en el HMD

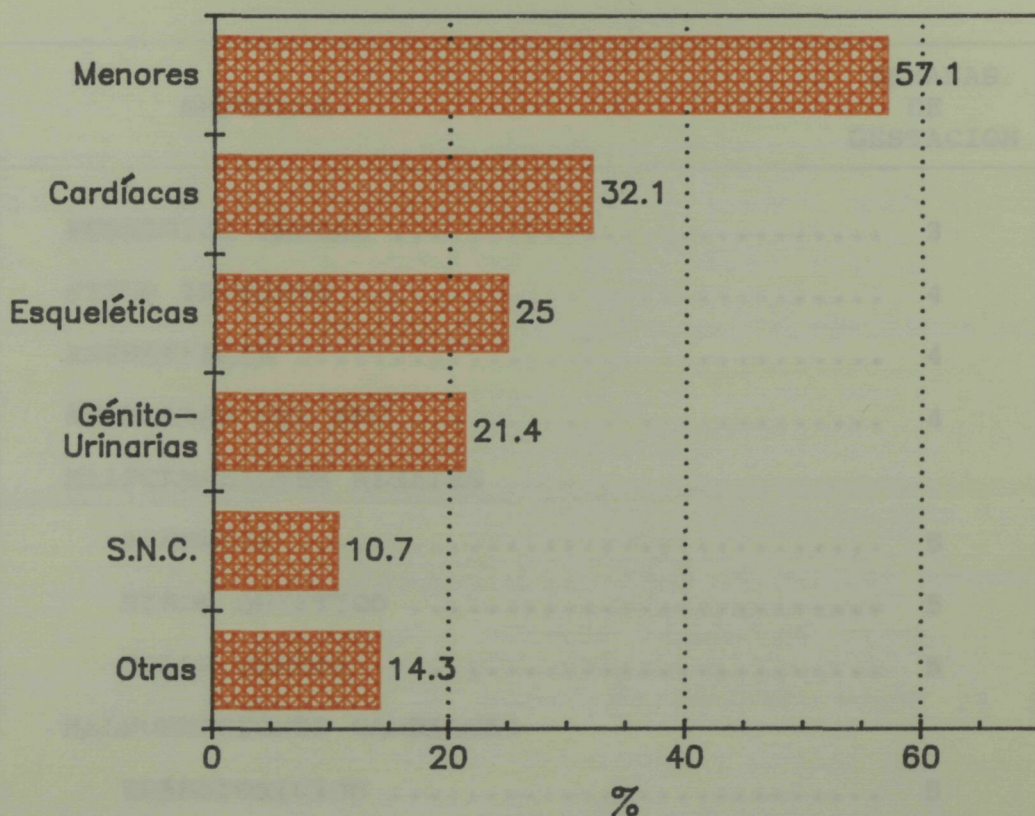


Figura 2.10.- Frecuencia de malformaciones en la muestra de recién nacidos hijos de diabética durante el sexenio 1980 - 1985.

aislada hasta el mielomeningocele con agenesia lumbosacra, extrofia vesical, atresia anal e inexistencia de genitales externos.

Por el tipo de malformaciones sabemos que la noxa que las produzca debe actuar muy precozmente, entre la 3ª y la 6ª semanas de gestación (Tabla 2.2). Es impor-

tante recordar que en esta fase la mujer desconoce habitualmente que está embarazada.

ANOMALIA	SEMANAS DE GESTACION
REGRESION CAUDAL	3
SITUS INVERSUS	4
ANENCEFALIA	4
ANOMALIAS DEL SNC	4
MALFORMACIONES RENALES	
AGENESIA	5
RIÑON QUISTICO	5
DOBLE URETER	5
MALFORMACIONES CARDIACAS	
TRANSPOSICION	5
DEFECTO SEPTAL	6
ATRESIA ANO/RECTAL	6

Tabla 2.2.- Periodo de aparición de las principales malformaciones halladas con mayor frecuencia en el HMD.

Es improbable que el fenómeno se deba a una gametopatía puesto que el riesgo de malformaciones en los recién nacidos cuyo padre es diabético es idéntico al de la población normal⁽¹⁹²⁾. Si la hipótesis fuese cierta

cabría esperar la misma frecuencia en que en los hijos de madre diabética. Tampoco se han hallado diferencias al estudiar los determinantes del sistema HLA⁽¹⁹³⁾. Es posible que la noxa actúe durante el periodo de blástula. De ser así debe producir tal grado de monstruosidades que no permiten el desarrollo vital y se eliminan como abortos, la mayor parte de veces no reconocidos. Por último, la actuación en el periodo embrionario es la más plausible y se han propuesto varias causas :

a)- Hipoglucemia-hiperinsulinismo : basada en dos hechos concretos. La inyección de insulina en los embriones de pollo y roedores produce anomalías vertebrales y esqueléticas en los fetos. En segundo lugar la frecuencia de malformaciones aumenta a medida que progresa la gravedad de la diabetes mellitus insulino-dependiente. Sin embargo existen dos hechos definitorios que se oponen. Por una parte la insulina materna es incapaz de atravesar la placenta, por tanto no podría tratarse de insulina exógena. Por otra parte la insulina endógena no se segrega hasta la semana 12, mientras que en esta época las malformaciones ya están presentes.

b)- Hipoxia embrionaria : actuaría en periodos críticos y en zonas concretas, secundaria a fenómenos de tipo trombótico. Estas trombosis prenatales han podido ser

demostradas anatomopatologicamente si bien se hallan más relacionadas con la última fase de la gestación y problemas de coagulabilidad (ver más adelante) que con la embriopatía.

c)- Hiperglucemia : es la causa que goza de un mayor predicamento. Se basa en cuatro datos :

c₁.- El control metabólico estricto reduce la frecuencia de las malformaciones como ha sido demostrado recientemente⁽¹⁹⁴⁾.

c₂.- Existe una elevada correlación positiva entre la hemoglobina glucosilada en el primer trimestre del embarazo (que es un marcador promedio de los perfiles glucémicos) y la frecuencia de las malformaciones⁽¹⁹⁵⁾.

c₃.- La hiperglucemia aguda es capaz de inducir cambios en el metabolismo de las células mesodérmicas tan importantes en su papel de inductores embrionarios, y se han propuesto dos teorías una de daño celular por causa hiperosmolar y otra debida a una disfunción de las glicoproteínas inductoras por alteraciones de su carga eléctrica secundarias a la glicosilación.

c₄.- Posibilidad de una hipoxia celular relativa secundaria a la hiperglucemia que facilitaría un estado hipermetabólico con aumento de la demanda de oxígeno (ver más adelante).

Es probable que sean varios los factores que concurren para producir alteraciones en estos centros inductores vitales para el desarrollo embrionario.

2.4.2.2. Efectos del hiperinsulinismo fetal

El efecto más directo del hiperinsulinismo fetal es la hipoglucemia que como se ha expuesto en el apartado 1.1.4 es la complicación más frecuente del estudio retrospectivo y el principal objeto de investigación de esta memoria. Por dicho motivo no se revisa este tema ya que es ampliamente comentado en la discusión de los resultados que se desarrolla en el apartado 5.

Se sabe hoy en día que la poliglobulia del hijo de madre diabética es secundaria a una hipoxia crónica intraútero y se acompaña de un aumento de eritropoyetina. Este fenómeno ha podido ser demostrado tanto en la especie humana^(196,197,198) como en modelos animales con experimentos más seleccionados⁽¹⁹⁹⁾. Aparentemente existe una paradoja. ¿Cómo es posible que con una hipoxia crónica el recién nacido sea macrosoma cuando debería esperarse todo lo contrario?. La respuesta podría resumirse diciendo que se trata de una hipoxia relativa que se produce en el territorio capilar a consecuencia de una excesiva desaturación de la sangre arterial por causa del acrecentado ritmo del metabolismo intracelular. En las diabetes graves

tipos E y siguientes de White, se encuentra la otra situación. En ellas los recién nacidos suelen ser de bajo peso para su edad gestacional puesto que aquí la hipoxia es ya arterial y secundaria a lesiones de vasculopatía placentaria y no puede compensarse el aumento en la demanda metabólica⁽²⁰⁰⁾.

Por lo que se refiere a la poliglobulia se relaciona con otros problemas patológicos como la ictericia que aunque primaria y fisiológica en el recién nacido puede ser potenciada de forma secundaria en las poliglobulias por un exceso de hemólisis y un desajuste entre la oferta de bilirrubina y la capacidad metabólica de un hígado inmaduro.

Siguiendo la misma vía fisiopatológica, son más frecuentes en el hijo de diabética los fenómenos trombóticos en los cuales la poliglobulia está involucrada a través de la hiperviscosidad y el enlentecimiento que provoca a nivel de la microcirculación. Tres problemas están claramente reconocidos : la trombosis venosa renal, la enterocolitis necrotizante y la presencia de trombosis de origen prenatal en los estudios necrópsicos de los hijos de diabética fallecidos anteparto de causa inexplicable. Pero se han descrito trastornos específicos en los mecanismos de la coagulación. Está demostrado un aumento de la agregabilidad plaquetaria por disminución de la

síntesis de la prostaglandina PGI_2 con aumento relativo del tromboxano TXA_2 . Esta anomalía está relacionada con el grado de control de la diabetes mellitus y se ha implicado la influencia de la insulina bloqueando el metabolismo del ácido araquidónico que lleva a la síntesis de las prostaglandinas^(201,202,203). Recientemente se ha señalado una correlación negativa entre la PGI_2 y el C-péptido en estos niños⁽²⁰⁴⁾.

Por último también se ha relacionado directamente con la insulina, el desarrollo de enfermedad de la membrana hialina que se presenta con más frecuencia y en edades gestacionales más tardías que en otros grupos neonatales^(205,206,207,208). Es conocido que existe un déficit de síntesis de fosfatidilglicerol, componente fundamental del surfactante pulmonar. Se propone un bloqueo directo por parte de la insulina de la incorporación de colina a la lecitina en el neumocito tipo II⁽⁵⁷⁾. Recientemente se ha resaltado el papel directo de la hiperglucemia como bloqueante de la maduración pulmonar fetal debido a una reducción en la capacidad de movilización del glucógeno⁽²⁰⁹⁾.

2.4.2.3. Efecto de los cuerpos cetónicos sobre el feto.

Ya se ha visto que la cetosis es una situación frecuente, especialmente en la diabetes tipo I, pero

también puede ocurrir en los otros tipos de diabetes mellitus durante el ayuno por el fenómeno de la "desnutrición acelerada". Además estas sustancias son capaces de atravesar la placenta y distribuirse por el organismo fetal. ¿Es dañina la cetosis para el feto?. El episodio de cetoacidosis aguda diabética, asociado a descompensación brusca está relacionado con la mortalidad antenatal^(171, 210). Un estudio realizado al efecto por Churchill y colaboradores ha demostrado que los recién nacidos de madre diabética con cetosis presentan un retraso psicomotor a los 8 meses de vida y una reducción significativa del cociente intelectual respecto a los controles normales⁽¹⁶⁴⁾. Una prolongación del estudio en recién nacidos de madres con cetosis y no diabéticas mostraron los mismos resultados. Es difícil achacar la causa del retraso psicomotor a la cetosis en exclusiva sin considerar qué otros factores subyacían en este estudio, pero la asociación es evidente⁽⁵³⁾.

2.4.2.4. Efecto de la hipoglucemia sobre el feto.

La hipoglucemia fetal es una consecuencia directa de la materna y ejerce un efecto sobre la función cardiovascular. Existen casos bien documentados en los que se registran patrones de bradicardia fetal coincidiendo con episodios de hipoglucemia materna con clínica acompañante⁽²¹¹⁾.

Otros complicaciones propias del hijo de diabética son la miocardiopatía hipertrófica^(212,213) y la hipocalcemia⁽²⁴⁾. Su causa aún no ha sido bien relacionada con los trastornos metabólicos y hormonales anteriormente citados.

Tras esta revisión resumida pueden comprenderse las expresiones utilizadas por los investigadores en este campo que comparan al recién nacido de madre diabética como un "auténtico experimento de la naturaleza" provocado por una alteración "del medio de cultivo" donde se va a desarrollar la primera etapa del nuevo ser⁽⁴²⁾.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. GRUPOS NEONATALES SOMETIDOS A ESTUDIO

3.1.1. PREMISAS BASICAS. CRITERIOS DE EXCLUSION

El estudio que se expone a continuación analiza *in vivo* una serie de fenómenos que acontecen en el recién nacido y que se caracterizan por su elevado dinamismo, especialmente en la primera hora de vida. De este análisis se pretende extraer conclusiones que expliquen los diversos mecanismos fisiopatológicos subyacentes. Además se intenta establecer una relación con otra serie de parámetros más estables como son los datos somatométricos, de control obstétrico y diabetológico maternos. Por este motivo es necesario evitar al máximo la interferencia de otros factores que sean capaces de dispersar los resultados introduciendo nuevas fuentes de variabilidad.

En este sentido se han excluido del estudio aquellos recién nacidos pretérmino (de edad gestacional igual o inferior a 36 semanas) y los postérmino (edad gestacional superior a las 42 semanas)^(1,39,146,214). También han sido eliminados los recién nacidos afectados de anoxia neonatal. Esto se debe a varias consideraciones. En primer lugar debe establecerse el concepto de anoxia neonatal. Aquí se considera cuando está presente alguno de los siguientes datos^(39,146,215,216) :

1º: Presencia de alteraciones de la frecuencia cardíaca fetal (FCF) de características patológicas. Se consideran como tales las siguientes :

- Aceleraciones uniformes de la FCF tras cada contracción uterina.
- Taquicardia mantenida superior a 160 latidos por minuto.
- Deceleración uniforme tardía : patrón de descenso de la FCF regular aunque de inicio retrasado respecto a cada contracción uterina.
- Deceleración variable en intensidad en cada contracción y de inicio precoz.
- Bradicardia fetal mantenida : cuando la línea de base de la FCF se sitúa por debajo de 120 latidos por minuto.

2º: Existencia de acidosis metabólica en la sangre capilar fetal (obtenida intraparto por punción del cuero cabelludo) o en la arteria umbilical medidos con un aparato MicropH/Blood Gas Analyzer^(R) modelo 413 de Instrumentation Laboratories. Los valores considerados patológicos son los siguientes:

- Sangre capilar fetal : $\text{pH} \leq 7.20$ y $\text{EB} \leq -5$.
- Sangre de arteria umbilical : $\text{pH} \leq 7.15$ y $\text{EB} \leq -8$.

En todos los casos se comprueba la normalidad del equilibrio ácido/base en la madre para evitar el

falso diagnóstico de sufrimiento fetal consecutivo a la transferencia de radicales ácidos al feto.

3º: Comprobación de una vitalidad fetal alterada mediante el test de Apgar que se considera patológico cuando al minuto es igual o inferior a 3 o bien a los cinco minutos es inferior a 7.

La eliminación de meconio intraparto se valora cuando coexiste con alguna de las tres alteraciones anteriormente citadas.

Es conocido como la hipoxia es capaz de dañar diferentes órganos o sistemas en función de su intensidad, duración y sensibilidad de los tejidos frente a la misma^(146,217). No se conoce bien el grado de afectación pancreática por la hipoxia; si bien se sabe que coexiste a menudo con hiperglucemia, para la cual se ha invocado un origen "adrenérgico" como manifestación de la respuesta neuroendocrina al *stress* que provoca la hipoxia y la acidosis⁽²¹⁸⁾. Esto sólo, sería ya de por sí suficiente para invalidar el caso pero aparte es lícito plantear la hipótesis de una alteración en la secreción de insulina por parte de la propia célula beta pancreática o incluso (y esto sí es bien conocido), la existencia de una resistencia a la acción periférica de la insulina sobre el receptor en los estados de acidosis⁽²¹⁹⁾.

A parte de estas consideraciones preliminares, los recién nacidos con sufrimiento fetal reciben un tratamiento farmacológico compuesto por furosemda y dexametasona (entre otros), fármacos ambos que alteran el metabolismo de la glucosa^(220,221,222).

Por todos estos motivos, estos niños se han excluido también del estudio.

En algún caso, la aparición en el curso evolutivo de complicaciones graves (tales como enterocolitis necrotizante, sepsis, etc.), obligó a suspender el estudio. También se ha controlado el hematocrito para evitar la anemia yatrogénica, suspendiéndose las extracciones si el hematocrito central descendía por debajo del 45%.

No se han diferenciado los niños en función del sexo, raza o condición, si bien se han registrado éstos como variables para comprobar la irrelevancia de este dato. Todos los casos son de Barcelona y su provincia donde las familias tienen su residencia habitual, acudiendo al Hospital Clínico y Provincial por propia iniciativa, por indicación expresa de algún facultativo, o bien provenientes del propio dispensario de Diabetología.

Estos recién nacidos han sido sometidos a un régimen de vida controlado durante el tiempo de su perma-

nencia en el Hospital. El destino de los niños se ha establecido siguiendo las normas asistenciales dependiendo del peso y de la patología presente. En todo momento han estado sometidos a un ambiente térmico neutro con los controles habituales de constantes (temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria) y coloración con un mínimo de una observación cada 6 horas (en *nursery*) o más frecuente en caso de estar ingresados. La alimentación se ha iniciado precozmente en todos los casos, administrando una primera toma de suero glucosado a las seis horas de vida. El tipo de lactancia se ha dejado a la libre elección materna, aunque también se ha consignado como variable para ver si es capaz de discriminar grupos.

En cada caso se ha practicado la exploración clínica rutinaria completa y diaria. En función de la anamnesis y de los hallazgos exploratorios se han practicado los exámenes complementarios oportunos según el protocolo al efecto que momentaneamente rige en el Departamento.

En todos los casos se ha informado previamente a los padres del motivo y metodología del estudio obteniendo consentimiento oral para el mismo ante un testigo.

3.1.2. RECIEN NACIDOS NORMALES (GRUPO CONTROL)

Se han considerado como tales aquellos recién nacidos a término, de peso adecuado y sin patología ni presente ni probable.

Para valorar la edad gestacional (E.G.), se han utilizado diversos métodos que se exponen a continuación.

El primero de ellos es a partir de la fecha de la última regla materna (F.U.R.). Cuando la madre conoce bien este dato sigue siendo el método más exacto.

Otros sistemas se han basado en recoger la altura uterina o bien el seguimiento del perímetro craneal fetal por ecografías sucesivas, siendo la precisión de este último de ± 2 semanas. Para las determinaciones del diámetro biparietal se ha usado un ecógrafo tipo HITACHI modelo EUB-340^(R).

En todos los casos se ha utilizado un método de valoración de la edad gestacional en el periodo postnatal. Concretamente hemos aplicado el test de Ballard⁽¹⁴⁶⁾ entre las 24 y 48 horas. La fiabilidad de la técnica es también de ± 2 sem. por lo que si la diferencia de apreciación entre la F.U.R. y el test de Ballard no supera las 2 semanas consideramos como válida la edad gestacional

calculada a partir de la F.U.R. Si la diferencia supera las dos semanas se acepta como válida la E.G. obtenida mediante el test de Ballard.

La adecuación del peso se comprueba una vez confirmada la E.G. en las tablas somatométricas confeccionadas por el propio Departamento y calculada a partir de la misma población de la que se seleccionan los casos para estudio⁽¹⁾

La ausencia de patología se acepta al constatar-se una normalidad en la exploración rutinaria de estos recién nacidos entre las 12 y 24 horas de vida, con evolución ulterior anodina y sin datos anamnésticos que hagan sospechar el riesgo de padecer una determinada patología.

Estos recién nacidos se consideran con un estado neonatal normal y pueden utilizarse de grupo control para efectuar comparaciones con otros grupos.

3.1.3. RECIEN NACIDOS HIJOS DE DIABETICA (HMD)

En este apartado se introducen todos aquellos recién nacidos cuyas madres hayan presentado a lo largo del embarazo algún trastorno demostrado en el metabolismo

de la glucosa. Por lo tanto existe la certeza de que durante el periodo de vida intrauterina, el recién nacido se ha hallado expuesto a los trastornos secundarios a esta intolerancia.

Como ya se ha comentado en el apartado 2.4.1 existen varias clasificaciones propuestas atendiendo a diferentes aspectos : clínicos, bioquímicos, fisiopatológicos, etc. A pesar de todo ello, probablemente la clasificación de White sigue siendo útil especialmente bajo un punto de vista clínico y obstétrico siempre y cuando se tengan en cuenta todas estas posibilidades. Por este motivo se ha escogido ésta en su formulación más reciente (223). La primera clase es la A englobando todos los tipos de diabetes gestacional y entendiendo como tal aquella intolerancia a los hidratos de carbono de gravedad variable que se inicia o bien es diagnosticada por primera vez durante el embarazo^(167,168).

El diagnóstico sigue los siguientes pasos (Figura 3.1). En primer lugar se practica un cribado a todas las gestantes que consiste exclusivamente en la determinación de la glucemia basal en dos ocasiones como mínimo a lo largo del embarazo. Una de las determinaciones se efectúa antes de la semana 24 de gestación. Si el resultado es normal, se repite la determinación de glucosa basal entre las semanas 24 y 28 para aumentar la sensi-

bilidad del diagnóstico. Se considera patológica toda glucemia basal superior a 105 mg/dl en ayunas (determinada por el método enzimático). Si además supera los 130 mg/dl ya es diagnóstica de diabetes tipo B y se inicia tratamiento. Si por el contrario, la glucemia oscila entre 105 y 130 mg/dl se pasa a practicar la prueba diagnóstica por excelencia : la sobrecarga oral de glucosa.

En un grupo especial de gestantes se realiza de entrada la prueba de sobrecarga debido a sospechosos antecedentes clínicos relacionados con la intolerancia a la glucosa. Estos son : diabetes mellitus familiar, macrosomía o muertes fetales intraútero, abortos de repetición, hidramnios, multiparidad, obesidad, candidiasis vaginal, edad superior a 40 años o bien diabetes gestacional diagnosticada en algún embarazo previo⁽⁸⁾.

Esta prueba sigue los criterios bien establecidos por O'Sullivan y Mahan⁽⁴⁹³⁾ y que son aceptados plenamente. Consiste en la administración de 100 gr. de glucosa a la embarazada con un máximo de 400 ml. de agua. Debe realizarse con un periodo de ayuno previo no inferior a 8 horas ni superior a 14 y habiendo disfrutado de una dieta de 3000 Kcal. y actividad física normal al menos durante los tres días anteriores. Tras la extracción basal se repiten a 1, 2 y 3 horas tras la sobrecarga. Durante este tiempo se debe permanecer en reposo relativo, (sentado) y

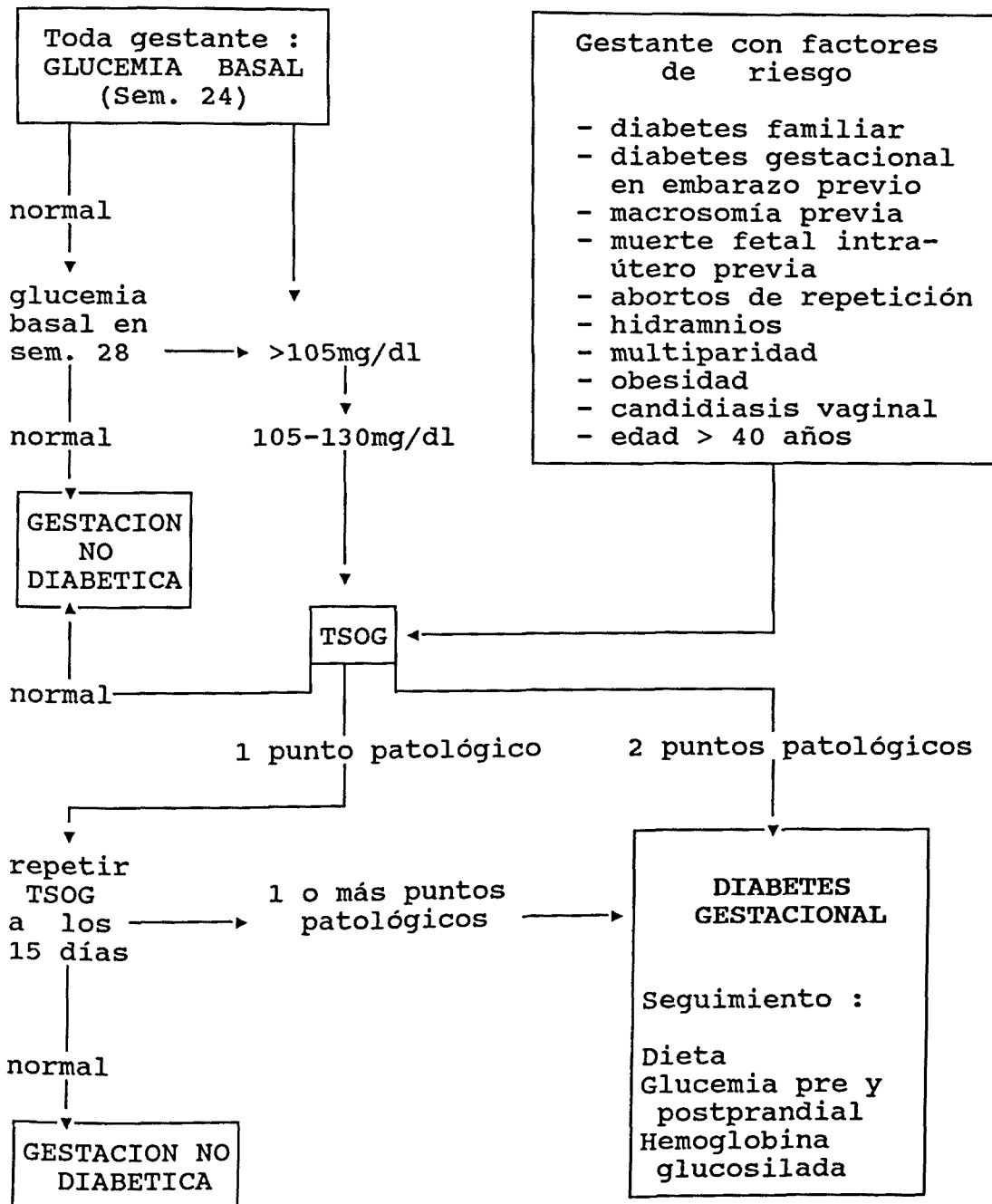


Figura 3.1.- Esquema diagnóstico de la Diabetes Gestacional en el Hospital Clínico de Barcelona.

sin fumar. La existencia de dos o más valores de glucemia superiores a los considerados normales en cada punto y en una misma curva, o la presencia de 1 valor alterado en dos curvas consecutivas repetida a los 15 días y realizada en las mismas condiciones establece el diagnóstico definitivo. Las diabéticas gestacionales ya diagnosticadas se someten a un régimen dietético y a unos controles estrictos para valorar su evolución. Este control se ejerce conjuntamente por un obstetra y un diabetólogo. Nunca se practica la sobrecarga oral de glucosa a edades gestacionales superiores a las 34 semanas.

El seguimiento analítico se realiza mediante una determinación glucémica doble, basal y postprandial a las 2 horas de realizar una ingesta estándar de 400 Kcal. Aquellas que presenten una glucemia basal superior a 115 mg/dl, una glucemia postprandial superior a 135 mg/dl o una hemoglobina glucosilada superior a 8.2% en algún momento tras el diagnóstico, reciben insulina exógena temporalmente para mejorar su control. En estos casos se siguen considerando como pertenecientes al grupo A, aunque, como se expone más adelante, se consigna dicho dato (Tabla 3.1).

La clase B de White corresponde ya a un tipo de diabetes que reciben insulina de entrada (como todas las que se citarán a continuación). Se trata de diabetes tipo

I con edad de inicio por encima de los 20 años, duración inferior a los 10 y no existe vasculopatía. También se incluyen aquí las diabetes tipo II cuya insulino-terapia durará todo el embarazo. Dentro de este último subgrupo es posible en algún caso excepcional controlar a la gestante exclusivamente con dieta. Se trata de diabéticas tipo II, obesas y con marcado hiperinsulinismo. La clase C consiste en aquellas pacientes cuya diabetes apareció entre los 10 y 19 años de edad o su duración supera los 10 años. Tampoco existe en este grupo vasculopatía detectable. La clase D se trata de pacientes con inicio de la diabetes en una edad inferior a los 10 años, duración superior a los 20 años y presencia de retinopatía simple, calcificaciones vasculares o hipertensión. La clase F incluye aquellas que presentan nefropatía o retinopatía proliferativa. En la clase G existen aquellos casos que presentan insuficiencia orgánica múltiple caracterizada por asociación de retinopatía con neuropatía, calcificaciones vasculares y nefropatía. La clase H engloba las pacientes en las que coexiste cardiopatía. Por último en la clase R se recogen aquellas que presentan una retinopatía proliferante maligna. Recientemente se ha añadido la clase T que correspondería a las gestantes diabéticas a las cuales ha sido preciso practicarles un transplante renal a consecuencia de la gravedad de su nefropatía previa. Indudablemente el control de estas gestantes es muy estricto y precoz. Del grupo C al T reciben insulino-terapia indefectiblemente.

A	DIABETES GESTACIONAL
B tipo I	INICIO EN EDAD SUPERIOR A 20 AÑOS O EVOLUCION INFERIOR A 10 AÑOS
B tipo II	DIABETES GESTACIONAL INSULINIZADA
C	INICIO ENTRE LOS 10 Y 19 AÑOS O EVOLUCION DE 10 A 19 AÑOS
D	INICIO A EDAD INFERIOR A LOS 10 AÑOS O EVOLUCION SUPERIOR A 20 AÑOS
E	EXISTENCIA DE RETINOPATIA SIMPLE
F	EXISTENCIA DE NEFROPATIA O RETINOPATIA DE TIPO PROLIFERATIVO
G	EXISTENCIA DE FALLO ORGANICO MULTIPLE
H	EXISTENCIA DE CARDIOPATIA
R	EXISTENCIA DE RETINOPATIA MALIGNA
T	ENFERMA TRANSPLANTADA RENAL

Tabla 3.1.- Clasificación de la diabetes mellitus en el embarazo según Priscilla White (actualizada).

3.1.4. RECIEN NACIDOS MACROSOMAS DE MADRE NO DIABETICA

Este grupo de recién nacidos engloba a todos aquellos neonatos a término y cuyo peso al nacer superaba los 4000 gr. y cuyas madres no eran diabéticas. El diagnóstico de exclusión de la diabetes materna se basa en las sucesivas determinaciones de la glucemia a lo largo del embarazo y la ausencia de clínica sugestiva (poliuria, polifagia, polidipsia y prurito) culminando con una última medición en el propio momento del parto. También se han valorado otros datos indirectos como la ausencia de antecedentes de alto riesgo, negatividad de los controles de glucosuria y en algunos casos en los que existía el antecedente de macrosomía familiar el diagnóstico de diabetes se ha descartado por la negatividad de la prueba de sobrecarga oral con glucosa.

A nivel neonatal se excluyeron otras causas de macrosomía patológica como el *hidrops fetalis* o el síndrome de Beckwith-Wiedeman para citar algunos ejemplos.

En todos los casos se ha comprobado la edad gestacional en el rango de 37 a 42 semanas y la situación del peso neonatal por encima de la tercera desviación estándar.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.1. CONSIDERACIONES GENERALES

El material de estudio se revisa en tres grandes subapartados, de los cuales los dos últimos consisten en sendas pruebas funcionales.

El primer subapartado lo constituye la recopilación de todos los datos relativos a la filiación, antecedentes, somatometría y control de la gestante y de su hijo. Entre los datos de control materno se encuentran parámetros clínicos y también parámetros bioquímicos como la hemoglobina glucosilada (HbA₁). La gran mayoría de esta información se obtiene de las historias clínicas de Obstetricia y Diabetología. Especialmente interesan todos aquellos relativos a la última semana de gestación.

El segundo apartado lo constituye el estudio glucémico en la primera hora de vida. Aquí se trata de valorar de forma lo más completa posible la cinética del descenso glucémico y los factores directamente relacionados con ella. Posteriormente se analizan éstos con detalle. En todos los casos se ha practicado el estudio personalmente sin interferir la conducta obstétrica a lo largo del parto. No sería ético forzar las cesáreas elec-

tivas en vistas a conseguir un mejor horario o bien estandarizar al máximo las condiciones experimentales. Sin embargo debe consignarse como variable para comprobar la hipótesis nula de que no influye el tipo de parto. La variable crítica en este caso será aquella que mejor refleje la intensidad de dicho descenso. Será por tanto la variable dependiente. A su alrededor habrá que analizar todas las variables consideradas como independientes.

El tercer apartado constituye la segunda prueba funcional que se basa simplemente en la práctica de una test de sobrecarga oral con glucosa. La prueba en detalle se especifica a continuación. Aquí la variable dependiente será el estímulo glucémico que se haya producido al final de la prueba y que coincide con el área definida bajo la curva de ascenso glucémico. El hecho de que se practiquen al 2º, 4º y 7º días de vida es para valorar el aspecto evolutivo de la respuesta pancreática durante la primera semana y comprobar modificaciones de la misma si es que existen. También aquí se han realizado todas las pruebas personalmente ajustando el horario dentro de las 24 horas correspondientes al día de estudio. Se ha tenido en cuenta también el tipo de alimentación del recién nacido sin influir en absoluto en la decisión materna. También se han consignado aquellos casos que recibieron aparte de glucosa por vía parenteral durante su estudio.

3.2.2. DESCENSO GLUCEMICO EN LA PRIMERA HORA DE VIDA

El descenso glucémico en la primera hora de vida es un fenómeno fisiológico en el recién nacido dentro de unos límites. Esto se explica por varios factores. En primer lugar la glucemia fetal es un fiel reflejo de la glucemia materna, pues la glucosa atraviesa la placenta por un mecanismo de difusión a favor de gradiente facilitado por un transportador que se ha propuesto saturable (53,225). Por lo tanto este aporte glucémico es contrario en mayor o menor intensidad.

Los fenómenos que se derivan del nacimiento propenden a un mayor consumo de glucosa. El fenómeno inmediato que aparece es la pérdida de dicho aporte de glucosa. A partir de este momento el recién nacido va a necesitar del aporte exógeno de la misma, bien por la alimentación (administración intermitente) o bien mediante una perfusión de suero glucosado en caso de que sea tratado por una hipoglucemia. Por lo tanto en esta primera hora depende exclusivamente de su propio metabolismo intermedio. Aparecen una serie de readaptaciones fisiológicas importantes como son la intensificación de la función respiratoria con el correspondiente aumento del trabajo muscular; el aumento del gasto cardíaco producido por el descenso de las resistencias vasculares pulmonares, el cierre de las comunicaciones derecha-izquierda (*foramen*

oval, ductus arteriosus) y el aumento de resistencias vasculares periféricas y en tercer lugar el inicio de su termorregulación, consecutivo al inmediato descenso de temperatura que se produce en su nuevo medio ambiente.

Bajo esta óptica se pueden hipotetizar los mecanismos de regulación involucrados :

- Aumento del consumo periférico de glucosa.
- Aumento de la afinidad del receptor de insulina en las células diana.
- Estimulación de la síntesis y secreción de hormonas de contrarregulación que activan la neoglucogénesis, lipólisis y la glucogenólisis como el glucagón, catecolaminas, el cortisol y la hormona de crecimiento.
- Atenuación de la secreción de insulina por parte de la célula beta pancreática.

La interpretación simultánea de todos estos parámetros se muestra sumamente compleja ya no sólo para su posterior análisis sino incluso para su realización práctica, fundamentalmente por la cuantía de material requerido y el costo que supone. Por este motivo y teniendo en cuenta los grupos de recién nacidos patológicos que van a ser estudiados, se ha escogido el estudio riguroso del funcionalismo pancreático endocrino, y de su marcador principal que es la concentración de glucosa en sangre.

Podría hablarse de estudio de la desaparición "espontánea" de glucosa ya que en este periodo no recibe aporte exógeno. De todas formas esta expresión haría referencia al fenómeno global ya que en particular el flujo de glucosa, se invierte en algunos tejidos como es el caso de la neoglucogénesis hepática.

En cuanto a la realización práctica del estudio se efectúa en el mismo paritorio durante el periodo del parto y en los 60 minutos siguientes al mismo. La conducta obstétrica se deja bajo la responsabilidad del equipo de Obstetricia que actúa según sus propios protocolos en función de la evolución del parto. En ocasiones dicha actitud puede haber sido decidida *a priori* (como son las cesáreas electivas, p.e.). Para paliar este factor de variabilidad se consigna en cada caso el tipo de parto y las incidencias del mismo. Tampoco se influye en el control metabólico de la gestante que como es lógico intenta ser óptimo en el caso de la gestante diabética y que corre a cargo del equipo de Diabetología. Sin embargo es posible que algunas gestantes diabéticas acudan sin control. Es también una variable codificada, así como también se registra el aporte y el tipo de líquidos que reciben en la perfusión. En caso de recibir aporte exógeno de insulina también se recoge la cuantía de éste.

Las extracciones se inician en la madre entre los 5 y 10 minutos previos al expulsivo. Se extraen 15 ml

de sangre venosa antecubital. Cinco ml se introducen en un tubo de vidrio con ácido epsilon-diaminotetracético tripotásico (EDTA-K₃) para la determinación de hemoglobina glucosilada (HbA₁). De los 10 ml restantes se reparten 5 ml en tubo de plástico con EDTA-K₃ más 0.1 ml de Trasylol^(R) (inhibidor de la actividad tripsínica del plasma) y que servirá para la determinación del glucagón (IRG) y el C-péptido (CPR) inmunorreactivos. El resto de sangre se introduce en tubo de plástico sin anticoagulante. El plasma servirá para la determinación de la insulina inmunorreactiva (IRI) y los anticuerpos anti-insulina si procede (Apartado 3.3).

En caso de que la madre lleve cualquier tipo de perfusión, la extracción se efectúa en la extremidad libre.

Inmediatamente tras el parto se recogen 10 ml de sangre de la vena umbilical y se distribuyen de forma similar a la materna, con las mismas condiciones en cuanto a tubos, anticoagulantes, reservando 4 ml para el estudio de hemoglobinas y los 6 ml restantes repartidos por igual para las mismas determinaciones. Todos los tubos se guardan inmediatamente en un termo portátil refrigerado de forma permanente a 4 °C para evitar la degradación y detener al máximo el consumo de glucosa por parte de las células sanguíneas.

Simultáneamente se determinan las gasometrías de arteria y vena umbilical, se inicia el recuento cronométrico desde la ligadura del cordón umbilical y se cuantifica el test de Apgar al mismo tiempo que se realiza la reanimación.

Una gota de sangre de la vena umbilical sirve para la valoración de la glucemia por reflectometría (Apartado 3.3.3). Esta misma medición se realiza a intervalos de 15 minutos durante la primera hora con sangre capilar arterializada (según el procedimiento habitual basado en una crema vasodilatadora) procedente de talón del recién nacido. De esta manera se controla el descenso glucémico en función del tiempo.

Durante este tiempo se mantiene al niño en incubadora a 34 °C en la misma sala de partos y se recogen los datos relativos a la placenta y a la somatometría del recién nacido.

A los 65 minutos se realiza una punción de vena femoral extrayendo 6 ml de sangre. Tres ml se introducen en un tubo de plástico con EDTA-K₃ y 0.1 ml de Trasylol^(R) para determinar CPR y IRG. Los 3 ml restantes van a un tubo de plástico sin anticoagulante de cuyo suero se determina la glucemia e IRI (Figura 3.2).

MODELO EXPERIMENTAL EN LA PRIMERA HORA DE VIDA

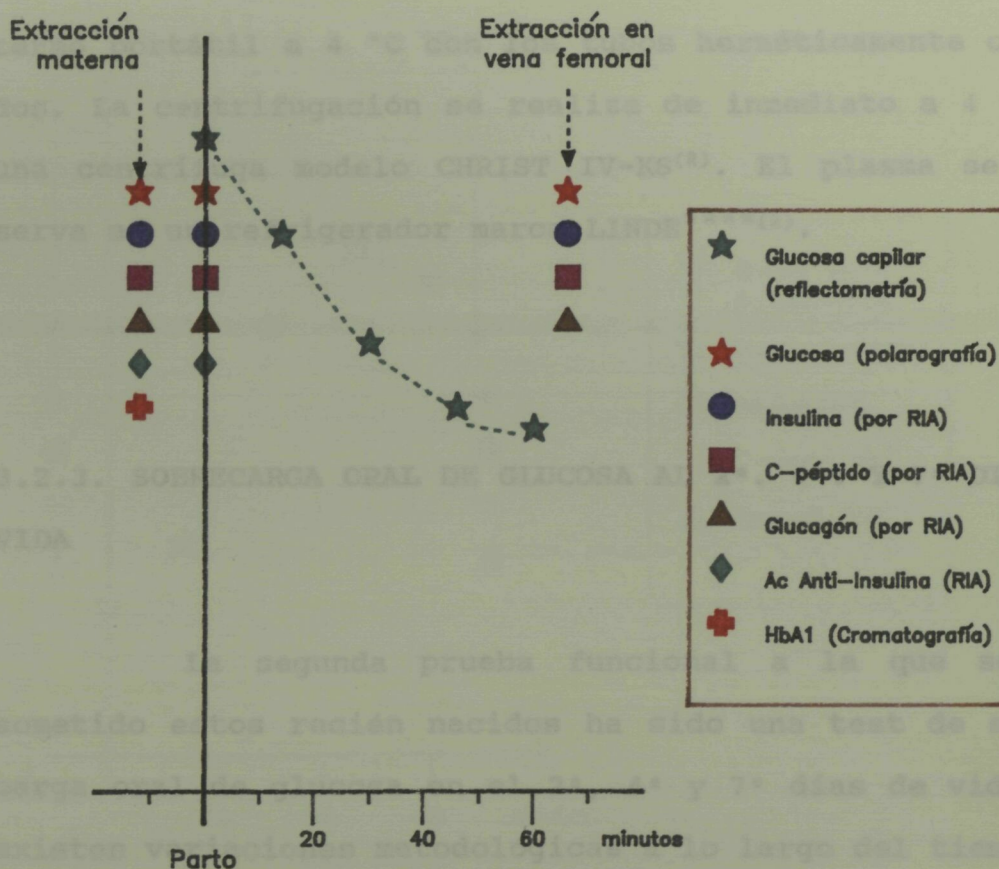


Figura 3.2.- Esquema experimental del estudio correspondiente a la primera hora de vida.

Si aparece una hipoglucemia antes de los 60 minutos de vida (glucemia capilar < 30 mg/dl) se practica de inmediato la extracción por punción femoral y se administra glucosa vía nasogástrica seguida de perfusión.

Los cálculos derivados de este diseño experimental se exponen más adelante (Apartado 3.4).

El almacenaje y transporte de las muestras desde la Sala de Partos hasta el Laboratorio, se efectúa en el termo portátil a 4 °C con los tubos herméticamente cerrados. La centrifugación se realiza de inmediato a 4 °C en una centrífuga modelo CHRIST IV-KS^(R). El plasma se conserva en un refrigerador marca LINDE^{****(R)}.

3.2.3. SOBRECARGA ORAL DE GLUCOSA AL 2º. 4º. Y 7º DIAS DE VIDA

La segunda prueba funcional a la que se han sometido estos recién nacidos ha sido una test de sobrecarga oral de glucosa en el 2º, 4º y 7º días de vida. No existen variaciones metodológicas a lo largo del tiempo en cuanto a la prueba en sí, por lo tanto una descripción sirve para todas las situaciones (ver figura 3.4). Se practica una extracción de 6 ml por punción femoral en estado "basal". Como tal se considera un momento a lo largo del día correspondiente en el que el tiempo transcurrido desde la ingesta anterior sea de 3 horas (en el caso de lactancia materna) o de 4 horas (en el caso de lactancia artificial). Corresponde pues al momento en que el recién

MODELO EXPERIMENTAL EN LA PRIMERA SEMANA DE VIDA

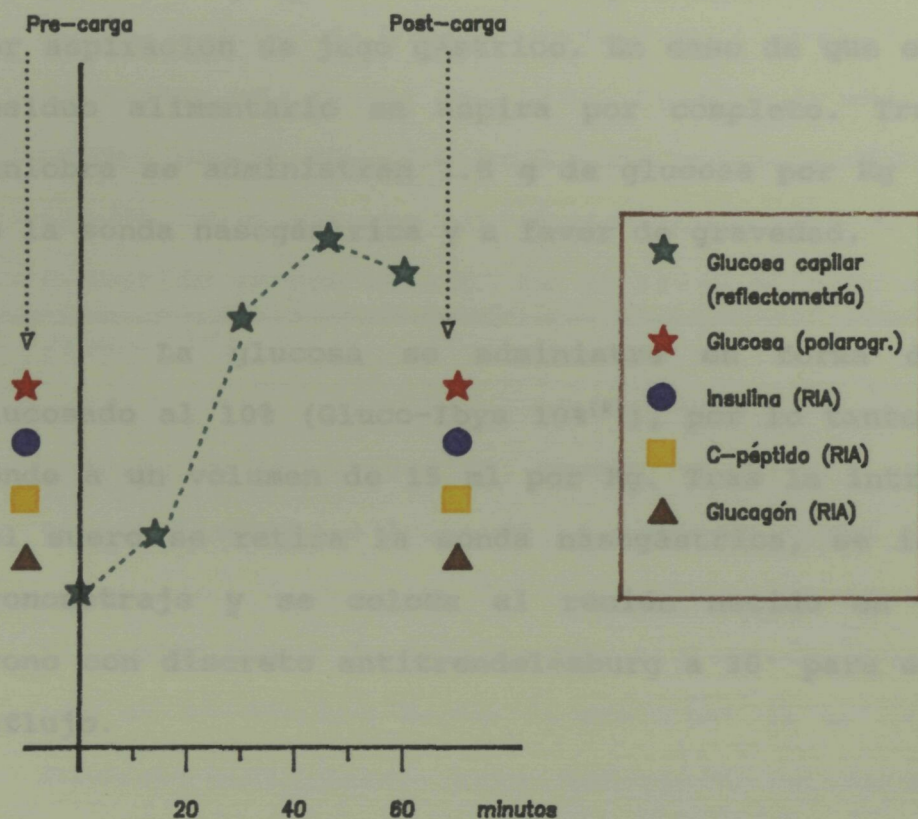


Figura 3.3.- Esquema experimental del estudio correspondiente al 2º, 4º y 7º días de vida.

nacido debería recibir la siguiente ingesta alimentaria. La distribución de sangre y las determinaciones realizadas así como la condiciones de transporte y almacenaje son idénticas a las descritas para la extracción practicada a

los 65 minutos de vida (Apartado 3.2.2). Simultáneamente se practica una determinación de glucemia por reflectometría en sangre capilar arterializada. Se pesa al R.N. para constatar su peso actual y se le introduce una sonda nasogástrica (Vigon nº 8^(R)) comprobándose su situación por aspiración de jugo gástrico. En caso de que exista un residuo alimentario se aspira por completo. Tras dicha maniobra se administran 1.5 g de glucosa por Kg a través de la sonda nasogástrica y a favor de gravedad.

La glucosa se administra en forma de suero glucosado al 10% (Gluco-Ibys 10%^(R)), por lo tanto corresponde a un volumen de 15 ml por Kg. Tras la introducción del suero se retira la sonda nasogástrica, se inicia el cronometraje y se coloca al recién nacido en decúbito prono con discreto antitrendelemburg a 30° para evitar el reflujo.

Cada 15 minutos durante la primera hora se determina la glucemia capilar. Así se va evaluando el ascenso glucémico. A los 65 minutos se repite la punción venosa femoral extrayendo 6 ml de sangre que sigue idéntico procesamiento a la muestra basal.

Ocasionalmente puede adelantarse o retrasarse la extracción femoral. Estas dos situaciones son las siguientes :

- a) Adelanto en la extracción : cuando tras un ascenso brusco de la glucemia se aprecia una caída rápida de la misma. Teniendo en cuenta que la vida media de la insulina es de 10-20 min^(76,88), como las determinaciones se suceden cada 15 minutos se puede de esta manera mejorar la interpretación de la insulinemia que es siempre una valoración más puntual y dinámica. Igual ocurre con el glucagon cuya vida media se cifra en 5-7 min⁽⁵⁶⁾. Sin embargo no es tan problemático para el C-péptido ya que la suya es de 20-40 minutos aproximadamente⁽²²⁶⁾.
- b) Retraso en la extracción: cuando se aprecia un aumento muy discreto o lento de la glucemia puede demorarse la extracción durante 15 ó 30 minutos manteniendo las determinaciones de la glucemia capilar en los intervalos de 15 minutos hasta la práctica de la extracción femoral definitiva. Esta variación no invalida en absoluto la prueba ya que las variables críticas en este caso no se afectan. Este retraso intenta comprobar si existe retardo de absorción de la glucosa, variable ésta que no puede ser controlada de forma directa mediante esta metodología.

Se ha escogido la ruta oral por dos motivos. En primer lugar es la más fisiológica ya que la alternativa endovenosa es artificial y más agresiva. Evidentemente la

administración endovenosa sería óptima bajo un punto de vista metodológico ya que eliminaría la variable absorción intestinal. Sin embargo por estudios practicados^(76,227) se conoce que la administración endovenosa de la sobrecarga de glucosa provoca una respuesta pancreática anormal con un primer pico agudo seguida de un pronunciado descenso a los 30 minutos y un segundo ascenso más lento y mantenido ulteriormente. Sin embargo la sobrecarga oral produce un aumento progresivo y mantenido de insulina que suele alcanzar un máximo a los 45-60 minutos aproximadamente. Por lo tanto en caso de administración endovenosa de la sobrecarga sería muy difícil valorar la insulinemia con sólo dos determinaciones, puesto que la propia oscilación de la respuesta sería superior que la variabilidad individual. La alternativa sería la práctica de extracciones repetidas en cortos intervalos pero obligaría a la cateterización de vasos umbilicales con todos los riesgos que ello comporta, y provocaría una rápida anemización del paciente máxime cuando no existe una indicación precisa para ello⁽²²⁸⁾.

Respecto a la cantidad, volumen y concentración del suero glucosado, existen otros autores que trabajan con cantidades de glucosa superiores de 1.75 a 2.25 g/kg^(227,229). Las recomendaciones actuales son de 1.75 g/Kg⁽¹⁶⁷⁾. Sin embargo preferimos ser conservadores y no provocar una excesiva estimulación a una célula beta

probablemente hipersensible ya en el caso del hijo de diabética. También hay autores y escuelas que prefieren administrar un volumen menor, aumentando la concentración (de 15 al 40%)^(227,229). Considerando de nuevo al grupo de recién nacidos patológicos, conocemos la mayor predisposición de éstos a la enterocolitis necrotizante^(39,146,230). Es preferible pues rebajar al máximo la osmolaridad de la solución administrada que en nuestro caso se sitúa ya por encima de los límites fisiológicos a 500 mOsm/litro. Conocido es el papel de la hiperosmolaridad como posible factor coadyuvante en la génesis de la enterocolitis necrotizante⁽²³⁰⁾.

A pesar de conocer la existencia de ritmos circadianos en multitud de situaciones fisiológicas y fisiopatológicas, este dato se ha considerado irrelevante en este grupo de edad, puesto que al parecer éstos empiezan a instaurarse entre la 3ª y 4ª semanas de vida extrauterina. Probablemente influyan en ello la inmersión a un medio ambiente con oscilaciones en las condiciones de iluminación y en el aporte calórico exógeno⁽²³¹⁾.

En la extracción basal del 4º día se saca 1 ml suplementario de sangre para una nueva determinación de hemoglobinas neonatales.

Durante todo el estudio se practican hematocritos para comprobar si éste desciende. En todos aquellos

casos en los que el hematocrito periférico sea de 45 o inferior se suspenden las extracciones.

No ha acaecido ningún problema patológico de anemia yatrogénica ni complicaciones derivadas de las punciones femorales (fístulas, infecciones, etc.)^(228,232).

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. VALORACION SOMATOMETRICA

Las variables somatométricas cuantificadas han sido el peso, la longitud (talla en la madre), el perímetro craneal y los pliegues subcutáneos (subescapular y tricipital).

El peso se ha evaluado en básculas clínicas especiales para recién nacidos y lactantes (modelo Atlántida, Añó-Sayol), previo equilibrado de la mismas en todos los casos. La precisión es de ± 0.01 Kg, suficientes para el tipo de estudio que se pretende. El peso neonatal se consigna en la misma sala de partos tras la reanimación inmediata, pinzado el cordón umbilical y con el recién nacido desnudo sin ningún aditamento. Para la práctica del test de la sobrecarga se debe también conocer el peso exacto *a priori* en situación basal. De todos los pesos registrados durante la primera semana (pesada diaria) también nos interesa el peso mínimo alcanzado para poder calcular la pérdida porcentual del mismo. Para facilidades ulteriores en el cálculo de variables derivadas tales como son la superficie corporal y el índice de masa corporal, el peso se consigna en kilogramos. También se pesa la placenta materna en la propia sala de partos con la misma

báscula, una vez seccionado el cordón umbilical sobrante (suele incluir unos 10-15 cm. de cordón). La madre se pesa en las básculas clínicas para adultos que llevan incorporado un tallímetro. La precisión es la misma. Este es el peso en el momento previo al parto. De la misma forma se han medido los pesos anteriores a lo largo de la gestación en las sucesivas visitas ambulatorias que la embarazada ha seguido. El peso habitual se conoce por la anamnesis y que se refleja en la historia clínica.

La longitud del recién nacido se registra con un tallímetro neonatal de precisión media (± 0.5 cm) para medición en decúbito supino. Este dato se mide siempre en las primeras 48 horas de vida y se consigna en centímetros por las mismas razones expuestas con relación al peso. En las madres la talla se mide con los tallímetros asociados a las básculas que permitan una precisión de ± 0.1 cm.

El perímetro craneal del recién nacido se valora a las 72 horas de vida midiéndolo con una cinta métrica inextensible que sigue la máxima circunferencia fronto-parieto-occipital. La precisión es de ± 0.1 cm y el retraso en la medición se debe a que en las primeras horas puede existir un acabalgamiento de parietales consecutivo al paso por el canal del parto que condicione unos valores por debajo de lo real.

Los pliegues subcutáneos han sido medidos tanto en la madre como en el recién nacido. Esto ha sido posible gracias a la utilización del lipómetro de presión continua modelo Holtain Ltd.^(R). Se ha escogido el pliegue tricipital y subescapular izquierdos como los más representativos. Tras pinzar 1 cm aproximadamente de tejido subcutáneo se coloca el lipómetro y se efectúa la lectura a los 10 segundos de aplicado el mismo. En el recién nacido la medición se efectúa en la primera hora de vida para evitar las variaciones consecutivas a la pérdida fisiológica de peso que repercuten directamente sobre este parámetro. La precisión es de ± 0.2 mm. En la madre esta medición se hace durante los tres días postparto⁽³⁶⁾.

A la hora de utilizar las tablas somatométricas para comprobar fundamentalmente la adecuación del peso y la desviación del mismo respecto al percentil cincuenta para la misma edad gestacional, se ha preferido utilizar las propias tablas confeccionadas en el Servicio ya que refleja nuestra "población"^(1,146). No obstante existen otras tablas nacionales muy completas y meritorias como el estudio de la Fundación Orbegozo coordinado por el Prof. M. Hernández⁽²³³⁾, sin embargo el período neonatal no está bien representado y están realizados sobre la población infantil del gran Bilbao pudiendo existir factores sociales que desvien un poco los resultados, tal y como ya se reconoce en la propia presentación del trabajo.

3.3.2. METODOLOGIA ANALITICA

3.3.2.1. Determinación de la glucemia

La determinación de la glucemia se realiza en dos materiales distintos : la sangre capilar y la sangre venosa central. El motivo de esta dualidad estriba en el imprescindible ahorro de sangre en las extracciones y en la evitación de la colocación de un cateter umbilical con los riesgos que comporta.

- a) Glucemia capilar : se determina por reflectometría en sangre total capilar-arterializada, ya que las técnicas comunmente utilizadas para la lectura visual con escala cromática se han mostrado sensibles pero poco específicas^(234,235,236), especialmente en la zona de valores por debajo de los 50 mg/dl que precisamente son los que interesan en el estudio de la primera hora de vida. En este sentido la polarografía aporta una mejor información⁽²³⁷⁾.

Material necesario:

- Reflectómetro: Reflocheck-Glucose^(R)⁽²³⁸⁾ que puede ser alimentado con una pila de 9 v. lo cual permite su transporte allí donde se encuentra el recién nacido.
- Tiras reactivas Reflocheck-Glucose^(R) con el material reactivo basado en el método enzimático de la glucosa-

oxidasa-peroxidasa. En su cara inferior dispone de un código de barras que es interpretado por un lector óptico cada vez que se introduce la tira en el aparato de reflectometría, calibrándose instantáneamente el microprocesador.

- Lancetas estériles desechables (de 1 solo uso).
- Algodón.
- Crema arterializante: se utiliza un preparado comercial, Finalgón^(R), con la siguiente composición:

Vanillilamida del ácido nonílico	0.4%
Ester β-butoxietílico del ácido nicotínico	2.5%
Excipiente	csp 20.0 g

Aplicación: esta técnica se utiliza para establecer las determinaciones seriadas de glucemia tanto de la primera hora de vida como del segundo, cuarto y séptimo días. Todas las muestras se extraen de talón excepto la correspondiente al punto 0 de la primera hora de vida que se toma de la sangre venosa umbilical.

Metodología :⁽⁵¹⁸⁾

- 1- Se arterializa el talón con Finalgón^(R), esperando un mínimo de 5 minutos antes de iniciar la experiencia. Una aplicación previa a la extracción basal mantiene la arterialización durante todo el tiempo que dura la prueba funcional.
- 2- Aseptización de la zona a puncionar con alcohol a 70%,

dejándolo secar antes de efectuar la punción.

3- Punción de talón.

4- Se deposita una gota de sangre que ocupe toda la superficie de la tira reactiva dispuesta para la reacción de oxidación.

5- Lectura con el reflectómetro. Esta operación tarda dos minutos. Tras la aplicación de la muestra de sangre se inicia un cronometraje negativo de 60 segundos. Al finalizar este tiempo una alarma sonora avisa, se procede a secar la sangre con algodón y se introduce la tira en el reflectómetro, iniciándose un cronometraje positivo de 60 segundos más. Tras esto aparece la lectura en pantalla de la glucemia.

6- Hemostasia de la zona de punción mediante compresión.

Rango de la lectura : de 20 a 450 mg/dl.

Mantenimiento : periódicamente se comprueba la exactitud de la medida mediante soluciones comerciales de concentración conocida de glucosa (Control-Test Glucose^(R)).

Características :⁽²³⁹⁾

Coefficiente de variación intraensayo: 2.6 %.

Coefficiente de variación interensayo: 3.5 %.

b) Glucemia en sangre venosa central: se determina por polarografía y electrodo de oxígeno en el plasma de

muestras de sangre extraídas por punción venosa femoral. Este método es de gran sensibilidad y especificidad por lo que sus valores son fiel reflejo de la glucemia sistémica puntual.

Material necesario:

- Autoanalizador ASTRA-4 Beckman^(R), con el módulo para la determinación de glucosa incorporado al sistema que contiene el reactivo con la glucosa-oxidasa y un termostato interno que mantiene la temperatura entre 36 y 38 °C.
- Plasma proveniente de la centrifugación refrigerada (4 °C) de la muestra decantado por pipeteo automático y mantenido a 4 °C hasta la determinación.

Aplicación : se utiliza para conocer la glucemia en todas las extracciones de sangre venosa sistémica sea materna, de vena umbilical o de vena femoral.

Metodología :⁽²⁴⁰⁾

- 1- Programación interactiva del ASTRA-4^(R) para la lectura de glucemia.
- 2- Aspiración automática de la muestra consumiendo un volumen máximo de 0.01 ml.
- 3- Resultado inmediato a los 52 segundos, de aspirada la muestra. Como esta aparato está ubicado en el laboratorio de urgencias su disponibilidad es de 24 horas al

día; por lo tanto, para evitar valores falsamente bajos de las glucemias, éstos se determinan sin demora tras la realización de cada ensayo funcional.

Rango de lectura: de 0 a 450 mg/dl.

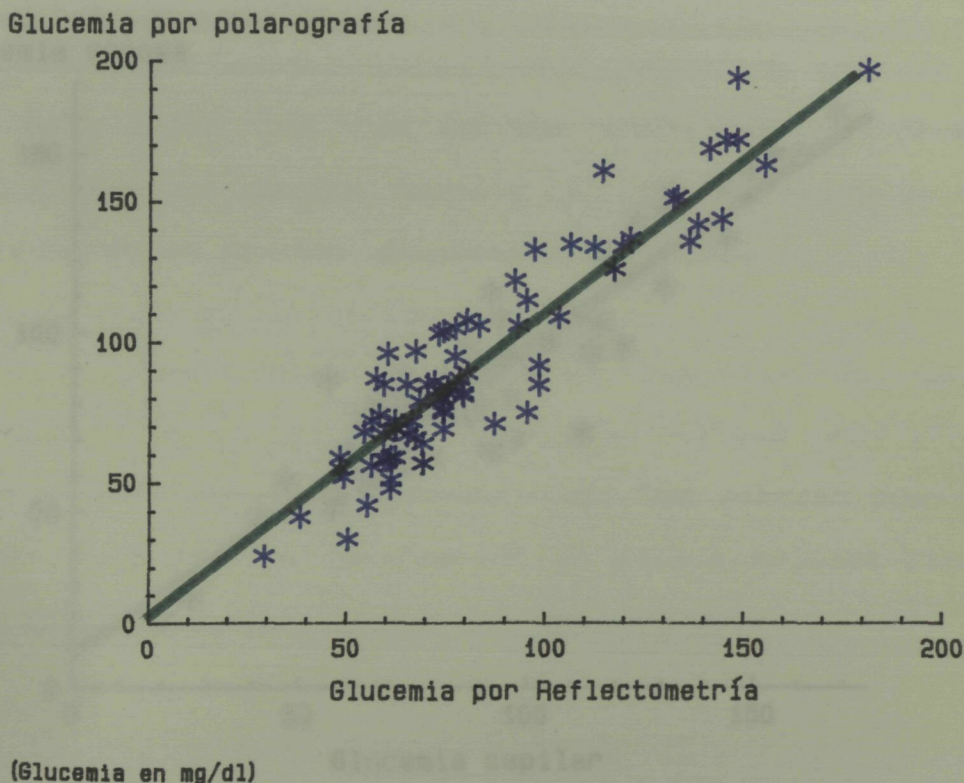
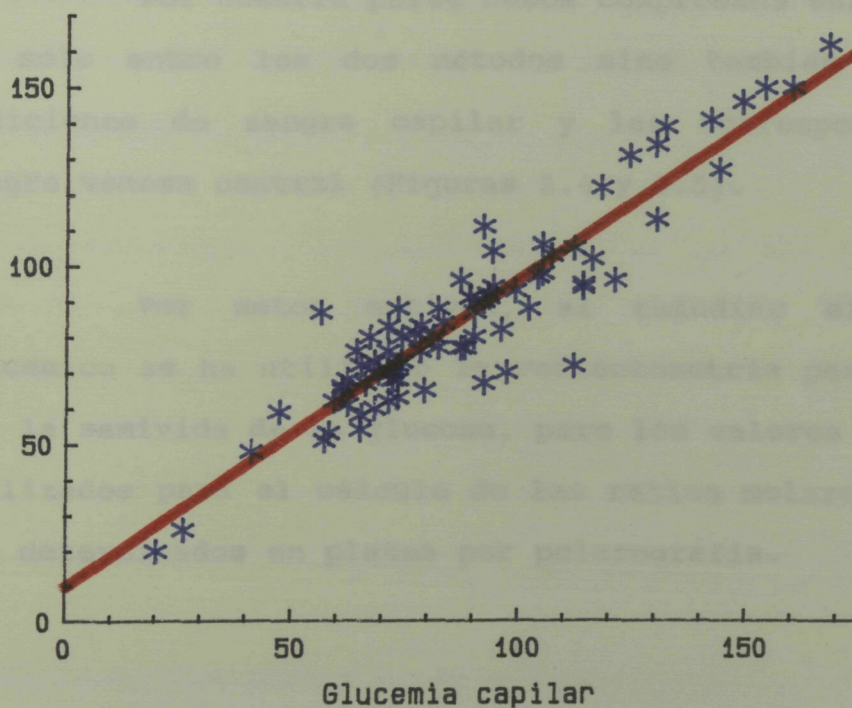


Figura 3.4.- Correlación entre la glucemia determinada por reflectometría y polarografía.

Mantenimiento : calibración automática cada 4 horas con soluciones especiales y posteriores controles normales bajos y altos.

Características : Precisión : ± 2 mg/dl.

Glucemia venosa



(Glucemia en mg/dl)

Figura 3.5.- Correlación entre la glucemia capilar y venosa determinadas ambas por reflectometría.

Existe una buena correlación entre ambos métodos según artículos publicados en la bibliografía. Rayman y cols.⁽²³⁹⁾ demuestran la práctica equivalencia de ambas técnicas cuando las glucemias se encuentran por encima de los 50 mg/dl ($r=0.996$, $b=1.01$, $a=2.9$). Por debajo de los 50 mg/dl la correlación sigue siendo buena aunque no es tan equivalente ($r=0.88$, $b=0.91$, $a=16$) con una tendencia por parte del método reflectométrico a sobrevalorar la glucemia.

Por nuestra parte hemos comprobado este hecho ya no sólo entre los dos métodos sino también entre las mediciones de sangre capilar y las correspondientes a sangre venosa central (Figuras 3.4 y 3.5).

Por estos motivos, al estudiar el descenso glucémico se ha utilizado la reflectometría para establecer la semivida de la glucosa, pero los valores puntuales utilizados para el cálculo de las ratios molares han sido los determinados en plasma por polarografía.

3.3.2.2. Determinación por RIA del título de anticuerpos anti-insulina.

Los anticuerpos anti-insulina se han determinado exclusivamente en aquellas gestantes diabéticas que lleven

un número mínimo de tres semanas de insulinización exógena cualquiera que sea la procedencia de esta insulina (porcina o humana). Su interés es doble. En primer lugar orienta hacia la técnica a utilizar para medir la insulina inmunoreactiva ya que en caso de estar elevadas es recomendable una extracción de los mismos previa al RIA. Por otra parte se ha propuesto que inmunocomplejos insulina-anticuerpo maternos, puedan atravesar la placenta gracias al mecanismo que permite el paso de IgG y una vez en el torrente circulatorio fetal el complejo se disocia y contribuya al hiperinsulinismo⁽²⁴¹⁾. Por este motivo se valoran también en la sangre del cordón umbilical.

Material : la técnica y material descritos a continuación no se encuentran comercializados con un *Kit* específico, pero se sigue la técnica de Kansall y cols.⁽²⁴²⁾, modificada para adaptarla a los protocolos del centro.

- a) Insulina I¹²⁵ porcina con una actividad específica de 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ pureza del 99% y estabilizada con tampón fosfato 0.04 M a pH=7.40.
- b) Charcoal-dextrano compuesto por :
- | | |
|---------------------------------|----------|
| Charcoal: Norit A (Sigma) | 5.0 gr |
| Dextrano T-70 (Pharmacia) | 0.5 gr |
| Tampón fosfato 0.04 M | 100.0 ml |
- c) Tampón fosfato 0.04 M, ajustado a un pH de 7.40 con NaOH 5N.

NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	5.52 gr
Albúmina bovina (V)	5.00 gr
Merthiolate	0.25 gr
Agua destilada y desionizada hasta	1000 ml

Metodología :⁽²⁴³⁾

- 1- Se incuban 100 ml de suero problema con 100 ml de Insulina I¹²⁵ durante 24 horas a 4 °C. Se incluye un blanco a base exclusivamente de tampón y un control de un suero normal que presumiblemente no tenga anticuerpos.
- 2- Se añade 1 ml de charcoal-dextrano y se deja 10 minutos a 4 °C para separar la insulina I¹²⁵ ligada a los Ac de cadena libre.
- 3- Se centrifuga 15 minutos a 4 °C y 1800 g.
- 4- Se decanta el sobrenadante en un tubo limpio y se cuenta en el contador de centelleo tipo LKB Wallac 80.000 Gamma Sample(R).
- 5- Se calcula el porcentaje de insulina I¹²⁵ unida con respecto al total previa sustracción del ligado inespecífico producido por el suero normal o el tampón.

Validación : tras controles propios establecidos al efecto, el límite superior de la normalidad se ha establecido en 3.62% que corresponde a la media más cinco desviaciones estándar. En casos con valores superiores al 8% se determina la insulinemia libre por el elevado riesgo de interferencia en el RIA.

3.3.2.3. Determinación de la insulinemia.

La insulinemia se determina por radioinmunoensayo siguiendo el método de Morgan y Lazarow⁽²⁴⁴⁾. La experiencia se practica de forma intermitente para permitir el acúmulo de muestras, lo cual abarata el coste y se disminuye la variabilidad interensayo. En todos los casos se han procesado pacientes "completos" en un mismo ensayo, para lograr una mayor homogeneidad en los resultados. El plasma ha permanecido congelado en frío (-20 °C) hasta su proceso. Este plasma proviene de las extracciones maternas y neonatales realizadas en sangre venosa sistémica.

Material : se utiliza el Kit comercial INSIK-1^(R) de Cea-Sorin compuesto por los siguientes reactivos :

- a) Insulina "fría" humana, a concentración de 200 μ U/ml estabilizada con tampón fosfato al que se le añaden 9 gr de NaCl por 1000 ml.
- b) Insulina-I¹²⁵ porcina con una actividad específica de 100 μ Ci/ μ g y una pureza del 99% , estabilizada con tampón fosfato.
- c) Primer anticuerpo : anticuerpo anti-insulina porcina obtenido en cobaya, disuelto en tampón fosfato a un título final de 1/150.000.
- d) Segundo anticuerpo : anticuerpo anti-inmunoglobulina de cobaya, obtenido de conejo, estabilizado en tampón

fosfato y con un título final de 1/4000.

- e) Tampón fosfato, 0.04 M ajustado a pH=7.40 con NaOH 5N
- | | |
|---|---------|
| NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O | 5.52 gr |
| Albúmina bovina (V) | 5.00 gr |
| Merthiolate | 0.25 gr |
| Agua destilada y desionizada hasta 1000 ml ⁽²⁴⁵⁾ . | |

Metodología :⁽²⁴⁶⁾

- 1- Preparación de la curva estándar a partir de la solución madre de 200 µU/ml :

Solución madre	St5 (200 µU/ml)
1 ml St5 + 1 ml tampón	St4 (100 µU/ml)
1 ml St4 + 1 ml tampón	St3 (50 µU/ml)
1 ml St3 + 1 ml tampón	St2 (25 µU/ml)
1 ml St2 + 1.5 ml tampón	St1 (10 µU/ml)
tampón fosfato	St0 (0 µU/ml)

- 2- Ensayo: durante 24 horas se incuban a 4 °C 100 µl de solución (estándar o problema) con 100 µl de una mezcla a partes iguales de los dos anticuerpos. Tras esta primera incubación se añaden 100 µl de la solución de insulina-I¹²⁵ y se deja incubando 24 horas más a 4 °C.
- 3- Se centrifuga durante 45 minutos a 4 °C y 1300 g.
- 4- Se decanta el sobrenadante y se pone a leer el precipitado en un contador de centelleo.
- 5- Si los anticuerpos anti-insulina superan un 8% se efectúa previamente a la técnica descrita una extracción

con etanol para eliminar los anticuerpos anti-insulina que interferirán con el RIA. Los pasos son :

- Mezclar 0.5 ml del plasma problema con 1 ml de etanol al 95%; agitar durante 1 minuto.
- Centrifugación a temperatura ambiente durante 45 minutos a 1800 g.
- Decantar el sobrenadante y evaporar con Nitrógeno líquido durante 6 horas. Utilizamos un evaporador modelo Labotron^(R).
- Se rediluye el extracto con 0.5 ml de tampón fosfato y se inicia el RIA habitual de insulina.

Se obtiene así la insulinemia "libre".

Validación :

Sensibilidad : 5 μ U/ml.

Coefficiente de variación intraensayo: 6.3%.

Coefficiente de variación interensayo: 14.9%.

Aplicación : Debe tenerse en cuenta que la especificidad de este procedimiento no es absoluta ya que existen reacciones cruzadas con otros componentes similares⁽⁸⁸⁾. En concreto existe un 7% de reacción cruzada con la proinsulina, un 0.2% de reacción cruzada con el glucagón y un porcentaje inferior al 0.01% con el C-péptido y con péptidos tipo "proinsulina" provenientes de una proteólisis incompleta.

3.3.2.3. Determinación del C-péptido

La determinación del C-Péptido es un método de gran interés para el estudio de la función de la célula B del páncreas precisamente en los hijos de madre diabética insulino-dependientes con posibles anticuerpos circulantes capaces de atravesar la placenta⁽²⁴⁷⁾. Su elevada especificidad, sensibilidad y reproductibilidad lo han convertido en un método muy útil para la evaluación de estos enfermos, teniendo en cuenta que se segrega de forma equimolecular con la insulina⁽²²⁶⁾. El plasma utilizado se conserva de la misma manera como se ha descrito en el apartado anterior para la insulina y proviene de las mismas extracciones.

Material : se utiliza el *Kit* comercial C-Peptide II^(R) de Daiichi Radioisotope Labs., basado en el método descrito por Kaneko y cols.⁽²⁴⁸⁾, compuesto por los siguientes reactivos :

- a) C-Péptido "frío" de naturaleza sintética presentado para preparar la curva estándar con la simple adición del tampón de fosfato.
- b) C-Péptido-I¹²⁵ de naturaleza sintética y tirosilado con una actividad específica de 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, estabilizado con tampón fosfato.
- c) Primer anticuerpo anti-C-Péptido, obtenido en conejo

con un título final de 1/10000 y estabilizado en tampón fosfato.

- d) Segundo anticuerpo antigammaglobulina de conejo, obtenido en cabra con un título final de 1/100.
- e) Tampón fosfato similar al utilizado para la insulina y con la única diferencia de hallarse a una concentración menor de 0.01 M.

Metodología :⁽²⁴⁹⁾

1- Preparación de la curva estándar en el siguiente intervalo :

St5	30.0 ng/ml
St4	10.0 ng/ml
St3	3.0 ng/ml
St2	1.0 ng/ml
St1	0.3 ng/ml
St0	0.0 ng/ml

2- Ensayo : durante 24 horas se incuban 100 µl de la solución estándar o problema con 100 µl del primer anticuerpo y 100 µl del C-Péptido-I¹²⁵. A continuación se añaden otros 100 µl del segundo anticuerpo dejándolo incubar 24 horas más.

3- Tras esta maniobra se centrifuga a 4 °C durante 45 minutos a unas 1300 g.

4- Se decanta el sobrenadante y se cuenta el precipitado en un contador de centelleo.

Validación :

Sensibilidad : 0.1 µg/ml.

Coeficiente de variación intraensayo: 5.5 %.

Coeficiente de variación interensayo: 7.94 %.

Aplicación : También en este caso debe tenerse en cuenta que la radioactividad detectada (que se denomina en general C-Péptido inmunoreactivo) puede corresponder en parte a proinsulina (ya que existe un cierto grado de reacción cruzada)⁽²⁴⁷⁾.

Ha podido ser demostrado sin embargo, que no existe reacción cruzada con insulina, glucagón, secretina o polipéptido gastrointestinal, ya que el determinante antigénico reconocido por el anticuerpo se dirige contra la región 33-43 de la proinsulina humana.

3.3.2.4. Determinación del glucagón

La posibilidad de determinar la glucagonemia fue descrita por Unger y cols. a finales de la década de los 50⁽²⁵⁰⁾. Sin embargo la técnica ha tropezado con diversos problemas que pueden resumirse en dos : por una parte la dificultad de lograr el anticuerpo por la escasa inmunogenicidad de la hormona⁽²⁴⁵⁾, y por otra parte la existencia de un conjunto de péptidos intestinales con actividad

similar al glucagón y con reacción cruzada frente a los mismos anticuerpos⁽⁵⁶⁾. Esto explica que no haya sido hasta un periodo relativamente reciente cuando se ha podido contar con el anticuerpo 30K desarrollado por el propio Unger y que tiene una gran especificidad por el glucagón pancreático⁽²⁵¹⁾ presentando una reacción cruzada mínima (de sólo el 3%) con el glucagón de origen intestinal o enteroglucagón⁽⁵⁶⁾.

Material :

- a) Glucagón porcino estándar (1.5 mg) del WHO International Laboratory for Biological Standards, ref. 69/194.
- b) Anticuerpo antiglucagón 30K del Dr. Unger (Texas University), obtenido en el conejo con un título final de 1:30000.
- c) Glucagón-I¹²⁵ de New England Nuclear con una actividad específica variable entre 80-120 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.
- d) Tampón glicina ajustado a un pH de 8.80 :

Solución de glicina 0.4 M (30 gr/l)	500 ml
Albúmina humana	5 %
Agua destilada y desionizada hasta	1000 ml

 Este tampón se emplea para todas las diluciones.
- e) Aponitrina, Trasylol^(R) (Bayer) 100.000 UK/5 ml.
- f) Solución Charcoal/Dextrano (idéntica a la descrita en el apartado 3.3.3.3).

Método : (252)

1- Soluciones de glucagón a concentraciones estándar :

St8	2000 pg/ml
St7	1000 pg/ml
St6	500 pg/ml
St5	250 pg/ml
St4	150 pg/ml
St3	100 pg/ml
St2	50 pg/ml
St1	25 pg/ml
St0	0 pg/ml (tampón)

2- Se inicia una incubación durante 4 días a 4 °C con la siguiente mezcla :

Aponitrina	100 µl
Solución estándar ó	
Solución problema	200 µl
Anticuerpo 30 K	400 µl
Glucagón I ¹²⁵	500 µl

3. Tras esta incubación prolongada se añade en frío :

Suero de cordero	100 µl
Solución charcoal/dextrano.....	500 µl

que se mantiene durante 45 minutos.

4. Centrifugación durante 20 minutos a 4 °C y 1800 g.

5. Decantar y leer el sobrenadante.

Validación :

Sensibilidad: 25 pg/ml.

Coeficiente de variación intraensayo: 8.05%.

Coeficiente de variación interensayo: 11.16%.

Aplicación :

Se utiliza en todas las extracciones de sangre venosa sistémica y por tratarse de la variante 30K nos mide prácticamente la radioactividad debida al glucagón pancreático.

3.3.2.5. Determinación de la HbA1 materna

Existen cuatro métodos para su determinación : los colorimétricos, la cromatografía, la focalización isoeléctrica y el radioinmunoensayo⁽²⁵³⁾.

Los métodos colorimétricos consisten en producir la hidrólisis del residuo 1-amino-1-deoxi-fructosa en un medio ácido débil y a 100 °C, con lo cual se desprende un compuesto denominado 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)^(254, 255). La reacción del 5-HMF con el ácido tiobarbitúrico (TBA) da lugar a un compuesto que puede medirse por espectroscopía a 443 nm. Su ventaja esencial es que no tiene interferencias con otras hemoglobinas como la HbF y la HbS. Sin embargo su reproductibilidad es baja ya que es un método no estequiométrico y debe eliminarse precisamente toda la glucosa libre⁽³⁹⁹⁾.

El radioinmunoensayo se concibió como un método muy específico y que requería una muestra muy escasa⁽²⁵³⁾, sin embargo no se ha logrado un anticuerpo de calidad por lo que en la actualidad se encuentra abandonado y no ha sido recomendado por el *National Diabetes Data Group* como técnica para la determinación del HbA₁⁽²⁵⁶⁾.

Dentro de los métodos cromatográficos se han descrito varios con distintas características⁽²⁵³⁾. La cromatografía como método inicial, preciso pero poco práctico, derivó hacia las técnicas de intercambio iónico en microcolumna⁽²⁵⁷⁾. Sin embargo son muy sensibles a pequeñas variaciones de temperatura, pH y osmolaridad del tampón. Otro gran defecto de esta técnica es la interferencia que se produce entre la HbA₁ y la HbF por lo que no puede utilizarse en el estudio de los recién nacidos ni en aquellas hemoglobinopatías que cursen con aumento de la HbF.

La cromatografía de afinidad, ha sido desarrollada recientemente^(258,259) como una buena alternativa basándose en la alta afinidad del ácido borónico por los compuestos glucosilados y es independiente de las variables temperatura, pH, fuerza iónica del medio y fracción lábil de la HbA₁, sin embargo parece que depende en parte de las condiciones del gel que sustenta el boronato y de momento existe una escasa experiencia en su utilización.

La focalización isoelectrica tiene un alto poder de separación de las hemoglobinas especialmente de la HbF respecto de la HbA₁ por lo tanto es el método de elección para el estudio del recién nacido.

Ante este panorama, atendiendo al volumen de muestras a procesar y al costo de las mismas, la determinación de la HbA₁ materna se ha practicado mediante el método de cromatografía de intercambio iónico en microcolumna, siendo conscientes de las limitaciones antes expuestas y de que se determina la HbA₁ en conjunto con sus fracciones a, b y c. En este sentido hay trabajos que demuestran la utilidad de la HbA₁ global⁽²⁶⁰⁾ sin necesidad de recurrir al fraccionamiento individualizado.

Material :

Se utiliza el *kit* comercial Glico Hb Quick Column Procedure^(R) de Helena Laboratories (Texas).

a) Microcolumna conteniendo :

Resina de intercambio catiónico

Cianuro potásico 0.065 %

Azida sódica 0.01 %

Tampón fosfato 0.04 M

b) Eluyente : Gluco Hb Developer^(R) que contiene el mismo tampón y conservantes que la resina de intercambio.

c) Solución hemolizante : Glyco Hb Hemolysate Reagent^(R)

Solución de saponina	0.01 %
Cianuro potásico	0.01 %
Azida sódica	0.01 %

Método :⁽²⁶¹⁾

1. Se mezclan 50 µl de la sangre problema con 200 µl de la solución hemolizante y se agita, esperando unos 10 minutos hasta completar la hemólisis.
2. Resuspender la columna de resina esperando unos 10 minutos hasta que vuelva a sedimentar.
3. Se depositan 50 µl del hemolizado en la parte superior de la columna, tras lo cual va descendiendo a lo largo de la resina impregnándola en 10 segundos.
4. Se coloca un tubo colector debajo de la microcolumna y se añaden 4 ml de solución eluyente en la parte superior. El eluyente tarda unos 30 minutos en atravesar la resina.
5. El eluido se mide en un espectrofotómetro Beckman DB-GT a 415 nm junto con una muestra del hemolizado diluido 5 veces para poder determinar el porcentaje de HbA₁ respecto al total (que así se expresa).

El cero se calibra utilizando agua destilada.

La fórmula que se aplica es :

$$\frac{\text{Absorbancia del eluido}}{\text{Absorbancia del hemolisado} * 5} * 100 = \% \text{ HbA}_1$$

Validación : Coeficiente de variación intraensayo : 2.5 %

Aplicaciones :

Esta técnica se ha utilizado en todas las determinaciones de HbA₁ realizadas en la madre, en cualquier periodo del embarazo.

3.3.2.6. Determinación de la HbF Neonatal

Esta técnica ha sido bien establecida por Singer y cols.⁽²⁶²⁾ y se basa en la resistencia a la desnaturalización por el álcali que muestra la HbF respecto a la HbA.

Material :

a) Solución de NaOH 1/12N (pH = 12).

NaOH 3.33 g
H₂O destilada hasta 1000 ml

b) Solución de sulfato amónico al 50% en solución saturada acidificada :

(NH₄)₂SO₄ 156.50 g
HCl 0.1N 1.25 ml
H₂O destilada hasta 500 ml

Método :⁽²⁶³⁾

1. A temperatura ambiente se mezcla 1.6 ml de NaOH 1/12N y 0.1 ml de hemolizado, agitándolo durante 60 segundos.
2. A los 60 segundos se añaden 3.4 ml de la solución acidificada con lo cual precipita la hemoglobina desna-

turalizada (en este caso la HbA).

3. Se filtra la solución.
4. Se lee en un espectrofotómetro, a 540 nm frente a un blanco de agua destilada. Se lee así mismo una muestra de 0.02 ml de hemolizado sin procesar mezclado con 5 ml de agua destilada para conocer la absorbancia de la hemoglobina total.
5. Se calcula mediante la siguiente fórmula :

$$\frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del hemolizado} * 5} * 100 = \% \text{ HbF}$$

Aplicación :

Esta técnica se utiliza en las muestras de sangre extraídas de vena umbilical, y la basal del cuarto día extraído de vena femoral.

3.4. TRANSFORMACIONES Y CALCULOS MATEMATICOS

3.4.1. INDICES SOMATOMETRICOS

La medición del peso y la talla aislados no son unos parámetros ideales para valorar la somatometría en detalle. Es por ello que se debe recurrir a índices que pongan en relación ambos datos o bien que hagan referencia a los criterios de estadísticos de normalidad.

3.4.1.1. Superficie corporal

La superficie corporal (SC) relaciona el peso y la talla y puede calcularse a través de unos nomogramas confeccionados al efecto⁽²²⁸⁾. Sin embargo cuando se deben procesar muchos casos es mejor utilizar una fórmula empírica, desarrollada por Haycock y cols.⁽²⁶⁴⁾ que sin ser exacta es una buena aproximación a la realidad. Su validación ha sido especialmente comprobada en recién nacidos.

$$S.C. = 0.024265 * (\text{Longitud})^{0.3964} * (\text{Peso})^{0.5378}$$

La altura se expresa en centímetros, el peso en kilogramos y de esta manera, la SC se obtiene en metros cuadrados. En el adulto, la longitud corresponde a la talla en posición erecta.

3.4.1.2. Índice masa corporal (IMC)

Es otra aproximación somatométrica que pretende normalizar el peso en función de la talla. Se calcula dividiendo el peso habitual en el adulto o el peso neonatal en el RN por la talla correspondiente elevada al cuadrado.

$$\text{IMC} = \text{Peso habitual} / (\text{Talla})^2$$

El peso debe introducirse en kilogramos y la talla debe constar aquí en metros.

3.4.1.3. Desviación porcentual respecto al P-50

Actualmente está en discusión la delimitación de la normalidad del peso según la edad gestacional tanto en su límite superior como inferior. Factores como la aceleración secular del crecimiento, los hábitos nutritivos de la población, etc., plantean dudas a la hora de considerar cuán grande es lo que es grande y viceversa. Una manera de paliar esta indecisión estriba en cuantificar de forma continua el alejamiento del valor considerado estadísticamente como media de una población normal. En este caso, respecto al recién nacidos nos referimos al peso que corresponde al percentil 50 para la edad gestacional

(valorada con los métodos descritos comentados en el apartado 3.1).

$$\text{Ratio P50} = \frac{(\text{Peso neonatal} - \text{Peso P50 para EG})}{\text{Peso P50 para EG}} * 100$$

La ratio no tiene unidades. El peso del P50 para la edad gestacional se determina en la tabla confeccionada en el propio Departamento^(1,146).

3.4.1.4. Desviación porcentual respecto al peso teórico

Este cálculo es similar al anterior para evaluar la desviación de peso en las madres gestantes. Aquí se toma como punto de partida el peso habitual (aquel peso previo a iniciarse el embarazo) y como punto de referencia el peso teórico de las madres extraído de las tablas de Diem y Lantuer⁽²⁶⁵⁾ que toman en cuenta la talla y la edad del adulto.

$$\text{Ratio desviación} = \frac{(\text{Peso habitual} - \text{Peso teórico})}{\text{Peso teórico}} * 100$$

3.4.2. ANALISIS DEL TRANSPORTE PLACENTARIO DE LA GLUCOSA

El modelo experimental diseñado para la primera hora de vida permite hacer algunas consideraciones sobre el transporte placentario de glucosa en los ya últimos instantes del embarazo.

Analíticamente se dispone de la glucemia materna en un período máximo de 5-10 minutos previos al expulsivo, y de la glucemia en sangre de vena umbilical.

Es conocido que el transporte de glucosa través de la placenta discurre a favor de gradiente en dirección madre-feto salvo contadas ocasiones de hipoglucemia materna extrema donde es posible que el sentido del flujo se invierta momentáneamente. A pesar del gran número de receptores de insulina que existen en la cara materna de la placenta, el proceso de transporte de la glucosa parece ser independiente y se ha propuesto la existencia de una molécula transportadora que facilitaría esta difusión. La alternativa sería una difusión simple a favor de gradiente sin existencia de transportadores.

En el caso de tratarse de una difusión simple cabría esperar que la glucemia fetal mantuviera una relación directamente proporcional a la glucemia materna,

ajustándose a una expresión matemática del tipo:

$$\text{Glucemia fetal} = a + b * \text{Glucemia materna}$$

En el caso de la existencia de una difusión facilitada por un transportador el modelo sería saturable alcanzando un equilibrio dinámico. Aceptando la existencia de un solo tipo de transportador el sistema se ajustaría más a la siguiente ecuación :

$$\text{Glucemia fetal} = \frac{B_{\max} * \text{Glucemia materna}}{K_d + \text{Glucemia materna}}$$

Esta expresión se deduce de la ecuación de Michaelis-Menten correspondiente a la relación de equilibrio entre los sustratos y su producto obtenido por la interacción de una proteína (en este caso el transportador) con unas características propias de máxima unión (B_{\max}) y constante de disociación (K_d) a un pH y temperatura determinados y constantes^(266,267).

Para resolver cuál de entre los dos modelos podría considerarse el más óptimo debe recurrirse a probar el ajuste estadístico de los datos experimentales a cada una de las dos ecuaciones mediante métodos de regresión no lineal que a través procesos iterativos van buscando aquel ajustado óptimo donde la suma individual de cuadrados (SS)

sea mínima tal como propone Boxenbaum y cols.⁽²⁶⁸⁾. La expresión general sería :

$$SS = \sum_i \sum_j W_{ij} * (C_{ij} - f_i(t_j, P))^2$$

donde C_{ij} sería el valor experimental de la variable independiente (y), $f_i(t_j, P)$ la función del ajuste con su valor teórico para y en función del parámetro P y W_{ij} el factor de ponderación (1, $1/C_{ij}$ ó $1/(C_{ij})^2$).

El estadístico utilizado aquí para la decisión objetiva es el AIC (*Aikake Information Criterium*)⁽²⁶⁹⁾ que viene definido por :

$$AIC = N * \ln(SS) + (2 * M)$$

donde N es el número de puntos experimentales, y M el número de parámetros que intervienen en la estimación (en nuestro caso 2).

Para facilitar estos cálculos que a menudo son costosos y complicados, han sido publicados distintos programas para micrordenadores, de los cuales se ha escogido el publicado por Yamaoka y cols.⁽²⁷⁰⁾ con ligeras variaciones (Apartado 3.4.6). El modelo óptimo es aquel que para el mismo número de parámetros e igual factor de ponderación logra un AIC menor.

3.4.3. ANALISIS DE LA CINETICA DEL DESCENSO GLUCEMICO

Como ya ha sido comentado en el apartado 3.2.2 durante la primera hora de vida cabe esperar un descenso glucémico a no ser que factores exògenos (como por ejemplo el *stress* consecutivo al sufrimiento fetal) lleguen a invertir la dinámica neta del flujo de glucosa. Esta situación hipotética no se da en nuestro caso porque el sufrimiento fetal es criterio de exclusión.

Simplificando, puede considerarse el descenso glucémico como una reacción de transformación :



Al considerar el comportamiento cinético de esta reacción pueden darse dos posibilidades :

- a) Que la velocidad de desaparición de la glucosa plasmática sea constante a lo largo del tiempo lo cual podría expresarse como :

$$- \frac{d(Gp)}{dt} = K \quad (1)$$

Este modelo corresponde a una cinética de orden 0.

- b) Que la velocidad de desaparición de la glucosa plasmática sea variable y guarde una relación proporcional con su propia concentración. En este caso la expresión de la velocidad de desaparición de la glucosa tomaría la forma :

$$-\frac{d(Gp)}{dt} = K * (Gp) \quad (2)$$

Este proceso seguiría una cinética de orden 1.

3.4.3.1. Proceso de orden cero

En este caso se integran ambos miembros de la ecuación (1) que transformada queda:

$$\int_0^{t_1} -d(A) = \int_0^{t_1} K * dt_1$$

Sustituyendo e integrando tenemos⁽²⁷¹⁾ :

$$(-A_{t_i} - (A_0)) = K * (t_0 - t_i)$$

Como A_{t_i} es A_i y t_0 es 0 tenemos :

$$A_0 - A_i = K * t_i$$

donde $A_0 - A_i$ es el decremento o desaparición de la glucosa en plasma que guarda una relación lineal inversamente proporcional con el tiempo. Despejando la velocidad K tenemos :

$$\frac{A_0 - A_i}{t_i} = - K$$

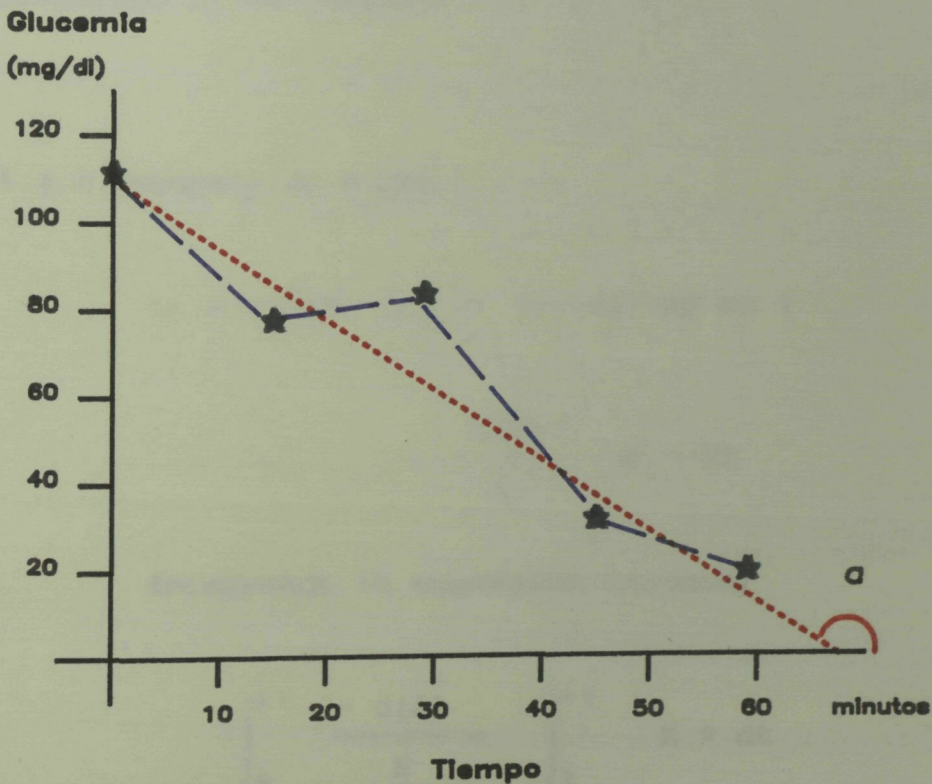


Figura 3.6.- Análisis de un proceso cinético de orden 0.

Las unidades aquí son concentración/tiempo (mg/dl/min). Precisamente K coincide con la $\text{tg } \alpha$ (Figura 3.6). Bajo una aproximación experimental es fácil deducirla haciendo la regresión lineal de las glucemias capilares respecto al tiempo. De esta regresión obtendremos una ecuación tipo :

$$Y = a - b * x$$

donde a será A_0 (concentración inicial de glucosa) y b será K. Así mismo se tendrá un coeficiente de correlación r_0 de Pearson.

3.4.3.2. Proceso de orden 1

La ecuación (2) se transforma en :

$$\frac{-d(A)}{A} = K * dt$$

Integrando la expresión tenemos:

$$\int_0^{t^1} \frac{-d(A)}{A} = \int_0^{t^1} K * dt$$

que resuelta, resulta ser :

$$(- \ln A_0 - (- \ln A_t)) = K * (t_0 - t_i)$$

Como t_0 es 0 tenemos :

$$\ln A_t - \ln A_0 = - K * t$$

Queda pues demostrado que existe una relación lineal inversa del tiempo con el logaritmo de la concentración (Figura 3.7).

Reordenando la ecuación tenemos :

$$\ln \frac{A_t}{A_0} = - K * t \quad (3)$$

Despejando la velocidad tenemos :

$$\frac{\ln \frac{A_t}{A_0}}{t} = - K$$

En este caso las unidades serían tiempo elevado a -1 (ej.: minutos⁻¹).

La aproximación experimental en este modelo se obtiene a partir de la regresión exponencial de las glucemias capilares respecto al tiempo ya que partiendo de $y=a*e^{bx}$ sustituyendo queda :

$$A = A_0 * e^{-k*t}$$

Aquí obtendremos así mismo un coeficiente de correlación r_1 de Pearson (Figura 3.7).

ln de la glucemia

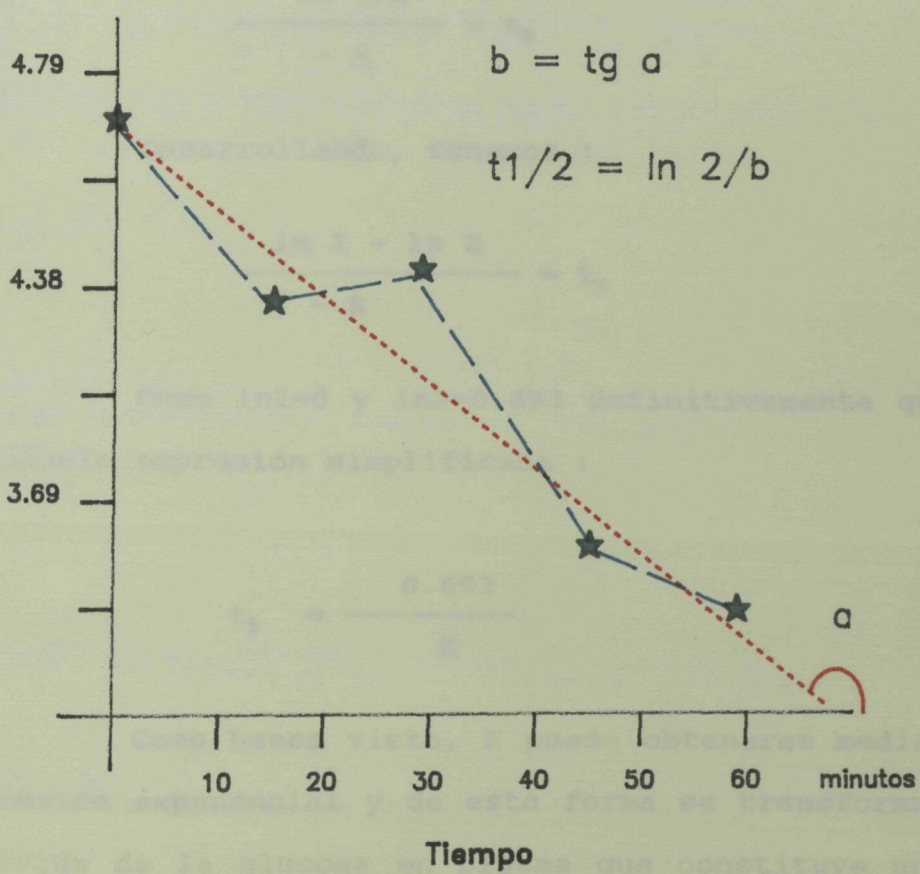


Figura 3.7.- Análisis de un proceso cinético de orden 1.

Sin embargo es más comprensible manejar el concepto de vida media como aquel tiempo en el que la concentración del sustrato (en este caso la glucemia) se haya reducido a la mitad. En este caso $A=1/2A_0$ por lo tanto sustituyendo en la ecuación anterior :

$$\ln \frac{1/2 A_0}{A_0} = - K * t_{1/2}$$

Despejando y simplificando :

$$\frac{\ln 1/2}{- K} = t_{1/2}$$

Desarrollando, tenemos :

$$\frac{\ln 1 - \ln 2}{- K} = t_{1/2}$$

Como $\ln 1=0$ y $\ln 2=0.693$ definitivamente queda la siguiente expresión simplificada :

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K}$$

Como hemos visto, K puede obtenerse mediante la regresión exponencial y de esta forma se transforma en la semivida de la glucosa en plasma que constituye un parámetro más comprensible y que se expresa en minutos.

Existen otros modelos cinéticos más complejos de segundo y tercer orden, pero no se ajustarían a la simplificación que hemos considerado al principio y su análisis sería harto complicado.

Es por ello que invocando el principio de la parsimonia nos vamos a limitar a estos dos tipos de cinética, eligiendo como modelo óptimo aquel que ofrezca un coeficiente de correlación r de Pearson mayor en valores absolutos.

3.4.4. ANALISIS DE SOBRECARGA ORAL DE GLUCOSA

La sobrecarga oral de glucosa es un proceso dinámico que como ya ha sido comentado en el apartado 3.2.3 depende de muchos factores. En primer lugar la absorción intestinal, la captación hepática, la inhibición de la neoglucogénesis y la utilización periférica de la glucosa gobernada por la acción de la insulina que a su vez es modificada para las variaciones de la glucemia.

Es por esto que lo mejor es considerar el estímulo glucémico como el área definida bajo la curva de sobrecarga, restándole el área "basal" que de haberse

mantenido, hubiera dejado a la célula B en situación quiescente.

Teóricamente el área es la integral definida de la función que representa la curva de sobrecarga. Sin embargo como hallar esta función es engorroso, es una buena aproximación efectuar el sumatorio de las áreas de los sucesivos intervalos en los que se ha ido determinando la glucemia (Figura 3.8).

Glucemia

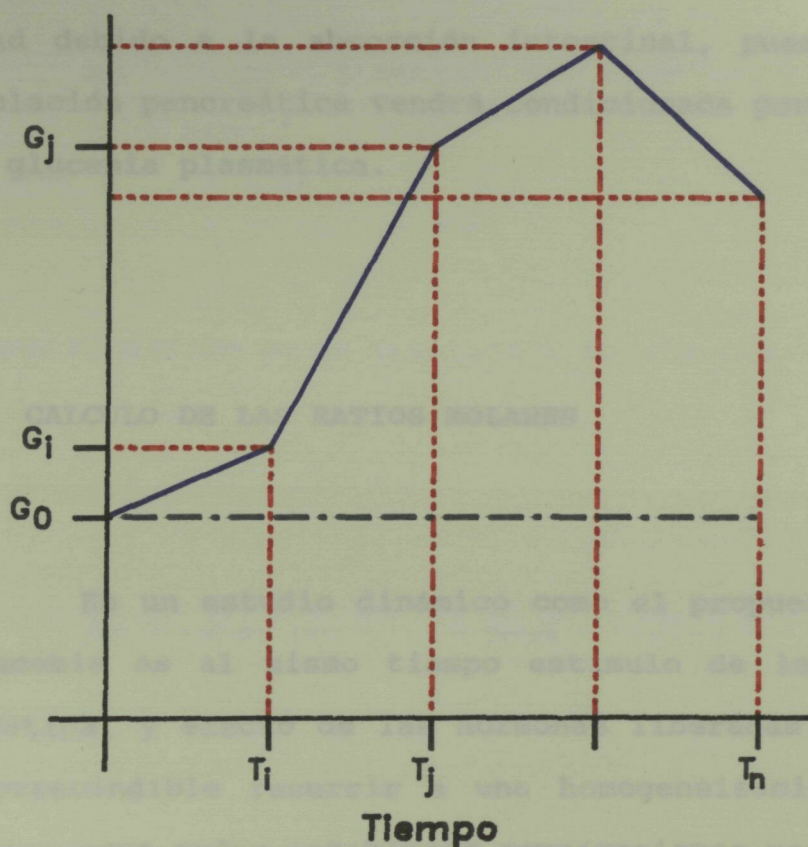


Figura 3.8.- Análisis de la sobrecarga oral de glucosa.

Siguiendo esta aproximación la fórmula general puede expresarse como sigue:

$$\text{Area} = \sum_{i=0}^{i=n} \frac{(G_i + G_{i+1})/2}{t_{i+1} - t_i} - (G_0 * t_n)$$

donde G_i es la glucemia en cualquier momento, t_i el tiempo transcurrido desde el inicio de la experiencia, G_0 la glucemia basal y t_n el tiempo en el que se ha determinado la última glucemia.

De esta manera se elimina el factor de variabilidad debido a la absorción intestinal, puesto que la estimulación pancreática vendrá condicionada por el ascenso de glucemia plasmática.

3.4.5. CALCULO DE LAS RATIOS MOLARES

En un estudio dinámico como el propuesto, donde la glucemia es al mismo tiempo estímulo de la célula β pancreática, y efecto de las hormonas liberadas por ella, es imprescindible recurrir a una homogeneización de las variables para poder establecer comparaciones mediante las ratios molares, expresión fraccionaria entre dos productos

que se encuentran normalizados a la misma concentración molar. El cálculo se realiza mediante simples factores de conversión a concentraciones nanomolares (nmol/litro = pmol/ml).

a) Conversión de la glucosa de mg/dl a pmol/ml :

$$1 \text{ dl} = 100 \text{ ml}$$

Peso molecular de la glucosa: 180 daltons

1 mol de glucosa = 180 gr de glucosa

1 milimol de glucosa = 180 mg de glucosa

1 milimol = 10^9 picomoles

$$\text{Glucosa} \frac{\text{mg}}{\text{dl}} * \frac{1 \text{ dl}}{100 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ mmol}}{180 \text{ mg}} * \frac{10^9 \text{ pmol}}{1 \text{ mmol}} = \text{Glucosa} \frac{\text{pmol}}{\text{ml}}$$

b) Conversión de la insulinemia de $\mu\text{U/ml}$ a pmol/ml :

1 μU de insulina = 0.04 ng de Insulina

Peso molecular de la insulina = 5807 daltons

1 nanomol de Insulina = 5807 nanogramos de Insulina

1 nanomol = 1000 picomoles

1 picomol de Insulina = 5.8070 nanogramos de Insulina

$$\text{Insulina} \frac{\mu\text{U}}{\text{ml}} * \frac{0.04 \text{ ng}}{1 \mu\text{U}} * \frac{1 \text{ pmol}}{5.8070 \text{ ng}} = \text{Insulina} \frac{\text{pmol}}{\text{ml}}$$

c) Conversión del C-péptido de ng/ml a pmol/ml :

Peso molecular del C-Péptido = 3021 daltons

1 nanomol C-péptido = 3021 nanogramos de C-Péptido

1 nanomol = 1000 picomoles

1 picomol de C-péptido = 3.021 nanogramos de C-Péptido

$$\text{C-péptido} \frac{\text{ng}}{\text{ml}} * \frac{1 \text{ pmol}}{3.021 \text{ ng}} = \text{C-péptido} \frac{\text{pmol}}{\text{ml}}$$

d) Conversión del glucagón de pg/ml a pmol/ml :

Peso molecular del glucagón = 3485 daltons

1 picomol de glucagón = 3485 picogramos de glucagón

$$\text{Glucagón} \frac{\text{pg}}{\text{ml}} * \frac{1 \text{ pmol}}{3485 \text{ pg}} = \text{Glucagón} \frac{\text{pmol}}{\text{ml}}$$

Transformada así las unidades pueden obtenerse directamente los ratios molares. Sin embargo es también posible su cálculo directo agrupando todas las transformaciones en una sola constante que actúa de factor multiplicador en cada expresión. El resultado es el siguiente :

1. Ratio molar insulina/glucosa :

$$\frac{\text{Insulina } (\mu\text{U/ml})}{\text{Glucosa } (\text{mg/dl})} * 12.42 * 10^{-8}$$

2. Ratio molar C-péptido/glucosa :

$$\frac{\text{C-Péptido } (\text{ng/ml})}{\text{Glucosa } (\text{mg/dl})} * 595.8 * 10^{-8}$$

3. Ratio molar glucagón/glucosa :

$$\frac{\text{Glucagón (pg/ml)}}{\text{Glucosa (mg/dl)}} * 0.52 * 10^{-8}$$

4. Ratio molar insulina/C-péptido :

$$\frac{\text{Insulina (\mu U/ml)}}{\text{C-péptido (ng/ml)}} * 0.0208$$

5. Ratio molar insulina/glucagón :

$$\frac{\text{Insulina (\mu U/ml)}}{\text{Glucagón (pg/ml)}} * 24.04$$

6. Ratio molar C-péptido/glucagón :

$$\frac{\text{C-Péptido (ng/ml)}}{\text{Glucagón (pg/ml)}} * 1153.31$$

Las tres primeros ratios molares tienen el sentido de normalizar los valores hormonales en función de la glucemia existente. Esto es necesario ante la imposibilidad de partir en todos los casos de la misma glucemia y por otra parte ya da una idea del grado de funcionamiento de las células endocrinas pancreáticas.

La ratio insulina/C-péptido tiene interés para valorar la degradación de la Insulina. Es sabido que la secreción de estas dos sustancias se produce de forma equimolecular, por lo tanto cabría esperar una ratio de 1, pero esto no sucede, debido a que el catabolismo de ambas es distinto en cuanto a vía y velocidad. Así mientras la insulina se degrada en el hígado y tiene una vida media de 5-10 minutos, el C-péptido es eliminado por vía renal y su vida media oscila entre 30 y 60 minutos. En situación de insuficiencia hepática o renal debe tenerse en cuenta. En nuestro caso se ha considerado especialmente la existencia de ictericia como indicador clínico de una mayor disfunción hepática ya fisiológica en el recién nacido.

Las ratios de la insulina y el C-péptido con el glucagón sirven para dar una idea del estado metabólico predominante en cada caso bien hacia el anabolismo (cuando predomine la secreción insulínica) o bien hacia el catabolismo (cuando predomine la secreción de glucagón).

De todas formas conviene una cierta cautela al interpretar las ratios, pues aunque su sentido biológico es importante, se debe tener en cuenta que aumenta el error original de la medida, y por otra parte debe analizarse si el origen de la variación reside en el numerador o en el denominador⁽²⁷²⁾.

3.4.6. VARIACIONES HORMONALES

A pesar de normalizar todos los cálculos descritos es interesante conocer la magnitud de variación de los parámetros estudiados, es decir el incremento o decremento (según los casos) de los valores de glucemia, insulina, C-péptido y glucagón. También conviene relativizar la variación en función del porcentaje de la misma que representa respecto al valor basal.

Para la primera hora de vida se han utilizado los siguientes cálculos :

a) Para glucosa, insulina y C-péptido :

Variación absoluta = Valor en cordón - Valor a los 60'

$$\text{Variación porcent.} = \frac{\text{Valor en cordón} - \text{Valor a los 60'}}{\text{Valor en cordón}} * 100$$

b) Para el glucagón, teniendo en cuenta que cabe esperar un incremento se expresa :

Variación absoluta = IRG a los 60' - IRG en cordón.

$$\text{Variación porcentual} = \frac{\text{IRG a los 60}' - \text{IRG en cordón}}{\text{IRG en cordón}} * 100$$

Para el segundo, cuarto y séptimo días de vida, solamente se ha calculado la variación de los parámetros hormonales, pues el área definida bajo la curva de sobrecarga es el mejor índice para valorar la oscilación de la glucemia. Teniendo en cuenta que cabe esperar un incremento de todos los valores tras el estímulo, incluido el glucagón, la fórmula utilizada ha sido :

$$\text{Variación absoluta} = \text{Valor a los 60'} - \text{Valor basal}$$

$$\text{Variación porcentual} = \frac{\text{Valor a los 60'} - \text{Valor basal}}{\text{Valor basal}} * 100$$

3.4.7. VARIACIONES DE LAS RATIOS MOLARES

Las variaciones de las ratios molares en la primera hora de vida se han calculado de forma absoluta y de forma relativa a partir de la diferencia de los valores de las mismas encontrados en sangre de cordón umbilical (Apartado 3.5).

3.4.8. COMPARACION DE SOBRECARGAS

Uno de los parámetros propuestos para realizar un estudio evolutivo de la respuesta frente a una prueba de sobre-

carga oral con glucosa protocolizada ha sido la ratio entre las áreas definidas bajo la curva. Como los valores son equivalentes no requiere transformación y como toda ratio, no tiene unidades de magnitud; el cálculo consiste en un simple cociente entre el área de la curva más reciente en el numerador y el área de la curva más antigua en el denominador. A igualdad de condiciones experimentales, si no existe variación en la respuesta cabe esperar una ratio situada alrededor de 1. Si su resultado difiere significativamente de la unidad cabrá la consideración de que la respuesta ha variado en uno u otro sentido.