

Recibido: 25 de noviembre de 1986
Received: november 25th, 1986

Accepted: 12 de enero de 1987
Accepted: january 12th, 1987

ALBERTO C. FRATI-MUNARI
JORGE RODRIGUEZ-RODRIGUEZ
PERLA ALTAMIRANO

receptores celulares de insulina en diabéticos por pancreatitis

Alberto C. Frati-Munari y Jorge Rodríguez-Rodríguez. Departamento de Medicina Interna, Hospital de Especialidades, Centro Médico "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México.

Perla Altamirano. Departamento de Medicina Nuclear, Hospital de Especialidades, Centro Médico "La Raza", México, D.F., México.

Solicitud de sobretiros (request for reprints): *Alberto C. Frati Munari.* Hospital de Especialidades, Centro Médico "La Raza", IMSS. Seris y Zaachila, CP 02990, México, D.F., México.

insulin cell receptors in diabetics by pancreatitis

Resumen

Con objeto de investigar el estado de los receptores celulares de insulina en la diabetes mellitus postpancreatitis, se estudiaron siete pacientes con diabetes consecutiva a pancreatitis y se compararon con diez voluntarios sanos. En todos se determinó la capacidad de unión a la insulina de los eritrocitos circulantes. La capacidad máxima de unión específica fue mayor en el grupo problema que en el testigo (23.0 ± 3.5 vs $14.6 \pm 1.9\%$ $P < 0.01$), lo que se atribuyó a un aumento en la afinidad de los receptores. Esta se encontró en cuatro diabéticos con deficit ponderal quienes además tenían disminución en el número de los receptores por eritrocito; en los otros tres diabéticos que tenían peso normal la afinidad y el número de receptores estaban en límites normales. El estado de los receptores eritrocitarios en la diabetes postpancreatitis es variable y entre otros factores, puede modificarse por el estado nutricional.

Abstract

To assess the status of cellular insulin receptors in postpancreatitis, diabetes erythrocyte insulin binding capacity was studied in seven patients with postpancreatic diabetes and in ten healthy controls. Maximal binding capacity was found higher in the diabetic group than in the control group (23.0 ± 3.5 vs. $14.6 \pm 1.9\%$, $M \pm SEM$, $P < 0.01$). This finding was due to enhanced receptor affinity in four diabetics ($k_e 0.597 \pm 0.086 \times 10^7 M^{-1}$) despite diminished concentration of insulin receptors (986 ± 28 receptor sites/ erythrocyte). The other three diabetic patients had both receptor affinity and concentration between normal limits ($k_e 0.274 \pm 0.057 \times 10^7 M^{-1}$, 1799 ± 15 sites/erythrocyte; control group $k_e 0.304 \pm 0.041 \times 10^7 M^{-1}$ and concentration 2240 ± 362 per cent). The former four subjects were also undernourished with 50 to 85 per cent of ideal body weight, while the other three diabetics were on ideal body weight ± 10 per cent. The status of erythrocyte insulin receptors in postpancreatic diabetes mellitus is variable and among several factors, it might be affected by the nutritional status.

En los últimos 15 años se han utilizado los isótopos radioactivos para demostrar los sitios celulares específicos (receptores) a los que se unen las hormonas polipeptídicas^{1,2}. Los receptores de insulina son los que más se han estudiado y se han podido determinar muchas de sus características. Por ejemplo, se sabe que están presentes en las membranas celulares de prácticamente todas las células que se han investigado¹⁻⁴; se ha caracterizado su estructura de glicoproteínas con dos cadenas alfa y dos cadenas beta unidas por puentes disulfuro^{4,5}; se ha observado que al unirse con la insulina, los complejos receptor insulina entran en la célula;⁶ y se empiezan a conocer las etapas siguientes en el interior celular.⁷

La capacidad de las células para unir insulina- I^{125} , y el número de sitios receptores por célula, se han estudiado principalmente en monocitos, eritrocitos y adipocitos, tanto en condiciones normales como en diversas enfermedades.⁴⁻¹⁰ En la diabetes mellitus no dependiente de insulina (tipo II) la concentración de los receptores de insulina en estas células se encuentra disminuida.⁴⁻¹³ En cambio en la diabetes dependiente de insulina (tipo I) los resultados han sido heterogéneos.¹⁴ En la diabetes postpancreatitis, sólo hemos encontrado un informe del estado de los receptores de insulina en el que se compararon con diabéticos tipo I, pero no con individuos normales.¹⁵ En este trabajo informamos de la determinación de los receptores de insulina en los eritrocitos de pacientes con diabetes postpancreatitis comparados con los de individuos sanos.

Material y métodos

Se estudiaron siete pacientes con diabetes post-pancreatitis, seis del sexo masculino y uno del femenino, con edad de 31 a 52 años (mediana 41). El diagnóstico de diabetes post-pancreatitis se basó en los siguientes datos: a) historia clínica típica de pancreatitis crónica, b) comprobación histológica de la pancreatitis o evidencia radiográfica de calcificaciones pancreáticas y c) aparición de la diabetes mellitus después de la pancreatitis. Excepto en un caso, no había antecedentes hereditarios de diabetes mellitus. Todos los pacientes recibían insulina intermedia (NPH) a la dosis de 30 a 60 U al día (media 40.7); ninguno se había tratado recientemente con hipoglucemiantes orales, no tenían cetosis ni enferme-

dades intercurrentes, cuatro tenían diarrea y recibían enzimas pancreáticas por vía bucal. Tenían hemoglobina sanguínea media de 13.1 (11.8-13.8 g/dl), volumen globular medio de 100 (88-103 μm^3) y reticulocitos menores al 1 por ciento. La única mujer tenía amenorrea en los últimos cinco meses.

El grupo testigo se formó con diez voluntarios sanos, siete del sexo masculino y tres del femenino, de 17 a 45 años de edad (mediana 32 años), sin antecedentes familiares de diabetes mellitus, con peso ideal ± 10 por ciento y no recibían medicamentos. Tenían hemoglobina sanguínea promedio de 15.1 (13.6 a 16.5 g/dl), volumen globular medio de 99 (88-102 m^3) y reticulocitos de 1 por ciento o menos. Las tres mujeres tenían menstruaciones regulares; al momento del estudio una se encontraba en la fase folicular y las otras dos en la fase lútea.

La muestra de sangre venosa para medir los receptores de insulina, la glucemia y la insulina sérica, se obtuvo a las 7:00 horas AM, después de 12 horas de ayuno. En los diabéticos la última aplicación de insulina había sido 22-24 horas antes. Para la determinación de receptores se obtuvieron 30 ml de sangre en una jeringa con 750 U de heparina, se depositó en un tubo de plástico en frío y se procesó según la técnica de radioreceptores descrita por Gambhir y cols¹⁶, en la que después de separar a los eritrocitos con gradiente de Fycoll-Hypaque, lavarlos con solución salina y buffer G (Tris, Hepes, a pH8), se ajustó la cuenta de eritrocitos a $1.8-3 \times 10^9$ en 400 microlitros, y se certificó la viabilidad de los glóbulos con la tinción con azul de tripano¹⁷. Se incubaron los eritrocitos en 14 tubos con 50 pg de insulina unida a I^{125} y concentraciones ascendentes (de 0 a 500 mM/1) de insulina no marcada, durante 90 minutos a 15°C. La unión no específica se determinó con un exceso (5000 mM/1) de insulina no marcada. Para separar los eritrocitos por gradiente de centrifugación, se mezclaron con dibutilftalato y buffer G, se centrifugaron a 15 000 RPM durante diez minutos a menos 4°C, y el fondo del tubo se cortó a nivel del botón eritrocitario. La radiactividad se determinó en un contador de gammas, tipo pozo, marca Searle modelo 1285. La cuantificación de eritrocitos de la muestra se practicó con un contador Coulter CRC. La capacidad máxima de unión de insulina- I^{125} se determinó con una curva de competencia.¹⁶ El número de sitios de la unión de la insulina (receptores) de los eritrocitos se calculó a partir de una gráfica de Scatchard¹⁶ con la

fórmula: número de receptores = (moles de insulina/litro ÷ concentración de eritrocitos/litro) X 6.03 X 10²³. El perfil de afinidad se obtuvo con el método de Meyts y Roth¹⁸, basado en la fórmula: $k = (B/F)/(R_0 - B)$, en la que k es la constante de afinidad según el porcentaje de ocupación de los receptores, B es la cantidad de insulina unida, F es la concentración total de insulina menos B, y R₀ es el sitio de intersección de la abscisa con la prolongación de la línea trazada en la gráfica de Scatchard. La constante de máxima afinidad (afinidad de los receptores vacíos), se tomó como la máxima afinidad obtenida con el perfil, o sea con la menor ocupación de los receptores.

La glucosa se midió inmediatamente en el plasma con el método automatizado de neocuproina (error intraensayo 3%). Para la medición de insulina se congeló el plasma a menos 20°C hasta que se procesó simultáneamente con radioinmunoanálisis (equipo C.I.S.), el coeficiente de variación intraensayo fue 13 por ciento para valores 5.7 ± 0.8, de 3.2% para valores de 50 ± 2 y 4.5 por ciento para valores de 202 + 10 uU/ml). Los resultados se expresaron como media ± error estandard a menos que se aclarara lo contrario en algunas figuras. El análisis estadístico se realizó con la prueba U de Mann-Whitney y la T de Student

según el caso, se consideró significativa una P < 0.05 con dos colas.

Resultados

La proporción de insulina unida a los eritrocitos fue significativamente mayor en el grupo con diabetes que en el grupo testigo, en todas las concentraciones de insulina utilizadas (fig.1). La capacidad máxima de unión específica fue de 23.05 ± 3.59 por ciento en los diabéticos y de 14.69 ± 1.97 por ciento en los testigos (P < 0.01).

Con la gráfica de Scatchard se obtuvo en ambos grupos la curva típica de los receptores de insulina (fig.2), en la que se nota que la porción final de la curva está más inclinada en los diabéticos que en los testigos y que la ocupación teórica de la totalidad de los sitios de unión se alcanza con menor concentración de insulina unida. En forma global el número total de sitios de unión (receptores) por eritrocito fue de 1334.3 ± 153.2 en los diabéticos y de 2241.4 ± 343.9 en el grupo testigo (P > 0.05). Sin embargo,

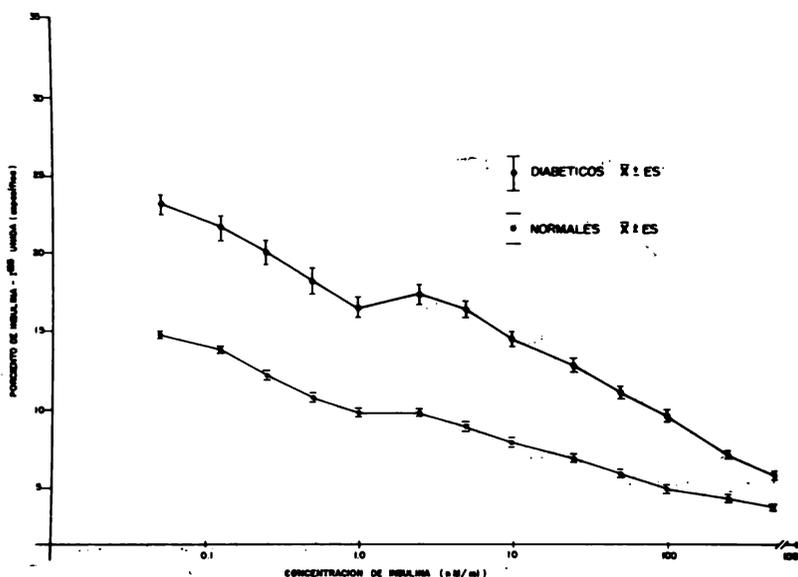


Figura 1. Capacidad de unión de los eritrocitos a la insulina, expresada como porcentaje de unión específica en las concentraciones de insulina utilizadas. La capacidad máxima de unión específica es la obtenida con la menor concentración de insulina. La capacidad de unión a la insulina es mayor en los diabéticos postpancreatitis que en los testigos sanos, en todas las concentraciones de insulina (P < 0.05).

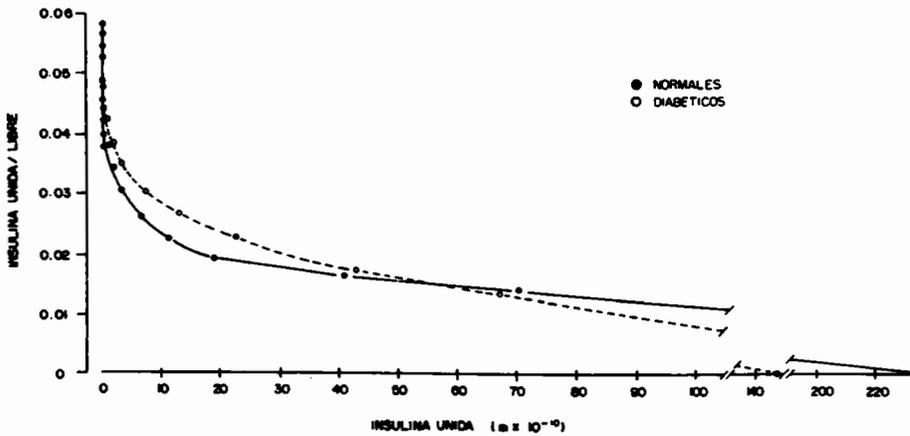


Figura 2. Análisis de Scatchard que muestra la curva típica de los receptores de insulina con los pendientes, una rápida dada por receptores de "alta afinidad" y poca proporción de ocupación y una lenta dada por receptores de "baja afinidad" y alta proporción de ocupación. Los puntos donde se unen la prolongación de las líneas de la gráfica y la abscisa (R₀) señala la concentración de insulina que se requiere para ocupar la totalidad de los receptores eritrocitarios de insulina, ésta es en promedio menor en los diabéticos postpancreatitis que en los sanos.

al analizar individualmente el número de receptores por eritrocito se observó que sólo en cuatro diabéticos el valor obtenido fue menor al de los testigos sanos, mientras que los tres restantes tenían receptores normales en número (fig.3).

La constante de afinidad de los sitios receptores no ocupados fue ligeramente mayor en los diabéticos ($0.458 \pm 0.082 \times 10^7 M^{-1}$) que en los normales ($0.304 \pm 0.047 \times 10^7 M^{-1}$) ($P > 0.05$). El análisis del perfil de afinidad de cada paciente (fig. 4A) mostró que los tres diabéticos con número normal de receptores eritrocitarios también tenían un perfil de afinidad similar al de los testigos, mientras que en los cuatro diabéticos con menor número de sitios de unión, la afinidad se encontró aumentada en cualquier porcentaje de ocupación de los receptores, es decir tanto en los receptores que se consideran de alta afinidad como en los de baja afinidad. El promedio de afinidad de los cuatro diabéticos con "alta afinidad" fue significativamente superior ($P < 0.01$) que el de los otros tres pacientes y que el grupo testigo (fig. 4B).

En los diabéticos la glucemia fue de 233.5 ± 35.2 mg/dl (amplitud 130—416 mg/dl), significativamente mayor ($P < 0.01$) que en los normales que tuvieron cifras de glucemia de 88.1 ± 2.6 mg/dl. Los niveles de insulina plasmática también fueron significativa-

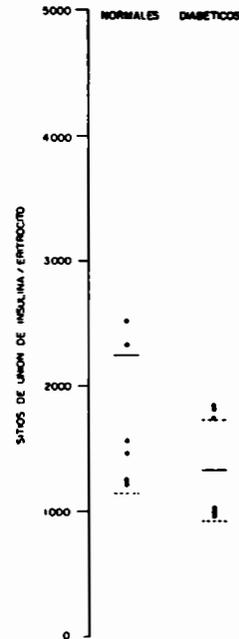


Figura 3. Número de sitios receptores de insulina por eritrocitos calculado a partir de análisis de Scatchard. Las líneas continuas señalan la media y las líneas interrumpidas señalan una desviación estandar. El grupo de diabéticos tiende a tener cifras más bajas que los sujetos testigos, cuatro de los siete diabéticos tienen menor número de receptores/eritrocitos que cualquier sujeto testigo.

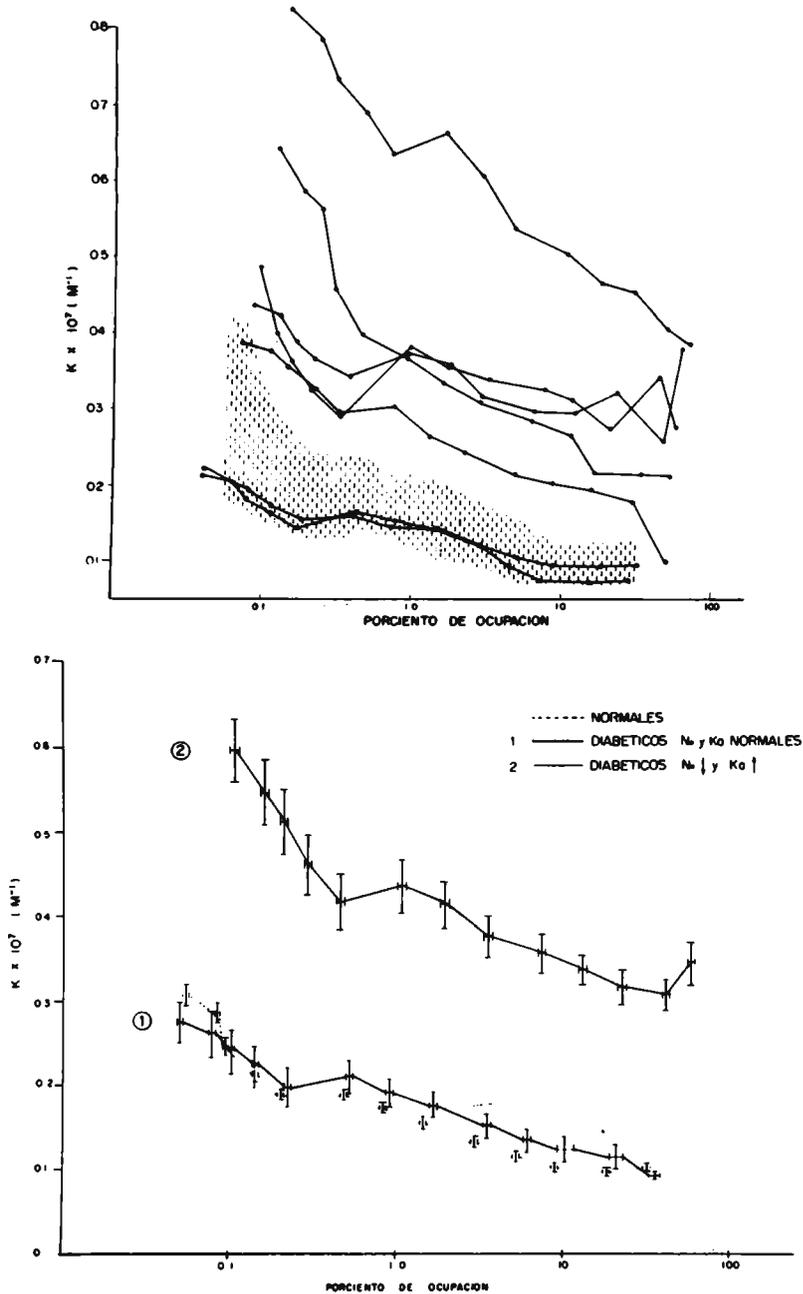


Figura 4. A. Perfil de afinidad de cada paciente con diabetes postpancreatitis. El área sombreada señala el perfil de afinidad (medida \pm SD) de los testigos. En cuatro de los diabéticos la constante de afinidad de los receptores por la insulina es mayor que en los testigos en todas las proporciones de ocupación; en otro más la afinidad es ligeramente superior que la "normal" en la mayoría de las proporciones de ocupación, pero su afinidad máxima queda en el área sombreada. B. Media \pm ES del perfil de afinidad de los sujetos testigo (línea interrumpida) y de los diabéticos postpancreatitis divididos en dos subgrupos: (1) tres pacientes con número de receptores y constante de afinidad máxima normales y (2) cuatro pacientes con número de receptores disminuido y constante de afinidad máxima aumentada.

mente mayores ($P < 0.01$) en los diabéticos que en los testigos, con $71.9 \pm 25.3 \mu\text{U/ml}$ y $17.4 \pm 3.6 \mu\text{U/ml}$ respectivamente.

Entre los cuatro con menor número y alta afinidad de receptores y los tres diabéticos con número y afinidad normales no se observaron diferencias en las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina, ni en la dosis terapéutica de insulina (tabla 1). Sin embargo, tres de los cuatro primeros tenían un déficit ponderal de 27 a 50 por ciento, mientras que los tres últimos tenían peso corporal normal.

Discusión

En la mayoría de los estudios clínicos se han determinado los receptores de insulina en monocitos y eritro-

citos. En general los resultados de los receptores en monocitos y eritrocitos guardan una buena correlación entre sí.^{19,20} La utilización de los últimos tiene la ventaja que requiere una muestra de sangre de volumen mucho menor, pero con la desventaja de que el número de receptores disminuye fisiológicamente conforme envejece la célula.²¹ La mayoría de los receptores que se determinan pertenecen a los eritrocitos jóvenes y a los reticulocitos, por lo que una variación en la edad de la población de los glóbulos rojos podría causar diferentes resultados. Por otra parte, los eritrocitos maduros no modifican fácilmente el número de sus receptores al incubarlos con insulina, a diferencia de los reticulocitos y de células nucleadas,²² lo que podría constituir una ventaja en algunas investigaciones no relacionadas con modificaciones agudas de los receptores, como sería el estudio actual. En este estudio no se practicaron procedimientos para precisar la edad de los eritrocitos, y

TABLA 1 NUMERO DE RECEPTORES DE INSULINA, CONSTANTE DE AFINIDAD MAXIMA (Ke) Y OTROS VARIABLES EN DIABETICOS POST PANCREATITIS Y EN INDIVIDUOS SANOS

CASO	NUMERO DE RECEPTORES/ERITROCITO	KE $\times 10^7 \text{ M}^{-1}$	GLUCOSA PLASMÁTICA mg/dl	INSULINA PLASMÁTICA $\mu\text{U/ml}$	DOSIS DE INSULINA U/día	PESO CORPORAL (% DE PESO IDEAL)
D I A B E T I C O S						
1	909	0.489	192	12.7	35	85
2	979	0.820	416	200.0*	75	50
3	1029	0.645	194	68.0	30	73
4	1030	0.436	205	13.9	30	68
5	1769	0.221	290	59.4	35	90
6	1810	0.212	205	117.0	35	108
7	1820	0.389	130	32.5	50	95
M \pm S.E.M.	1335 \pm 165	0.458 \pm 0.082	233.5 \pm 35.2	71.9 \pm 25.3	41.4 \pm 6.1	81 \pm 7.2
T E S T I G O S						
1	1048	0.541	89	14.9	—	90
2	1233	0.507	87	46.2	—	95
3	1264	0.367	103	11.1	—	95
4	1469	0.278	89	9.0	—	108
5	1586	0.315	98	13.1	—	105
6	2331	0.261	74	6.9	—	100
7	2521	0.216	88	27.3	—	100
8	2794	0.163	78	11.9	—	110
9	3727	0.206	88	18.7	—	105
10	4435	0.189	87	15.0	—	100
M \pm S.E.M.	2240 \pm 362	0.304 \pm 0.041	88.1 \pm 3.6	17.4 \pm 3.6	—	100.8 \pm 1.9

*Anticuerpos antiinsulina circulantes

aunque el grupo de diabéticos tenía cifras de hemoglobina sanguínea ligeramente menores que el grupo testigo, en ningún caso hubo reticulocitosis, por lo que es poco probable que hayan tenido una proporción elevada de eritrocitos jóvenes.

Los resultados obtenidos en el grupo testigo son similares a los informados por otros autores en individuos sanos.^{16,19} En forma global en el grupo de individuos con diabetes post-pancreatitis la capacidad de unión de la insulina a los eritrocitos fue mayor que en los individuos sanos. Este aumento en la capacidad de los eritrocitos de unirse a la insulina no se debió a un aumento concomitante del número de los sitios receptores, pues éste estaba disminuido en unos pacientes y normal en los otros, sino que fue debido a una elevación de la afinidad por la insulina.

La disminución en el número de los receptores ocurre en la obesidad, en la diabetes mellitus no dependiente de insulina y en otras enfermedades caracterizadas por tener resistencia a la insulina e hiperinsulinemia.^{4,7-10} El número de los sitios receptores de insulina está regulado por la concentración de insulina a la que está sometida la célula *in vivo* o *in vitro*. A mayor concentración de insulina es menor el número de receptores.⁷⁻¹³ Esta regulación "descendente" (down regulation) probablemente se debe a que conforme aumenta la concentración de insulina, también aumentan los receptores que se unen a la hormona y que entran a la célula, y por lo tanto queda un menor número de receptores disponibles para la unión subsiguiente con más insulina.

El número de receptores celulares de insulina se encuentra disminuido en los individuos con hiperinsulinemia, ya sean obesos o diabéticos, y también en los sanos con hiperinsulinemia por la dieta.^{7-13,20-24} Por el contrario, al impedir la secreción de insulina con diazóxido, la capacidad de unión celular a la insulina aumenta.²⁵ En la diabetes mellitus dependiente de insulina (tipo I), la capacidad de unión de los monocitos y eritrocitos a la insulina se encontró disminuida en unos pacientes con hipoinsulinemia moderada, y aumentada en otros con hipoinsulinemia severa y cetosis, pero ambos grupos se normalizaron con el tratamiento con insulina.¹⁴ Los pacientes de este estudio con diabetes consecutiva a pancreatitis también eran dependientes de insulina y recibían dosis variables de esta hormona. A pesar de ello, los niveles plasmáticos de insulina en ayunas fueron mayores que en los

individuos normales, seguramente por la administración de insulina exógena, aunque no se determinaron las concentraciones de péptido C. La hiperinsulinemia en este grupo de diabéticos explica el menor número de receptores eritrocitarios de la insulina. Nosadini y col.,¹⁵ en un grupo de pacientes con diabetes debida a pancreatectomía o a pancreatitis crónica, encontraron que éstos tenían capacidad de unión y número de receptores eritrocitarios de insulina mayores que un grupo de diabéticos tipo I, aunque ambos recibían dosis similares de insulina y tenían niveles semejantes de insulina sérica. Tales hallazgos, que correlacionaron con mayor sensibilidad a la insulina, no pudieron atribuirse claramente a algún factor determinado.

La curva típica de los receptores celulares de insulina que se observa en el análisis de Scatchard se ha interpretado como debida a la existencia de receptores de alta afinidad que se ocupan con pequeñas concentraciones de insulina, y de baja afinidad que se ocupan con altas concentraciones de insulina, ya sea con afinidad "fija", o más probablemente como resultado de "cooperatividad negativa" en la que a mayores concentraciones de insulina la afinidad disminuye.^{26,27} En cuatro diabéticos postpancreatitis se observó una afinidad mayor que en los individuos normales en todas las proporciones de ocupación, es decir tanto en los receptores de alta como en los de baja afinidad.

Los factores que regulan la afinidad de los receptores de insulina no se conocen bien. Una mayor capacidad de unir insulina con afinidad aumentada se ha encontrado en los eritrocitos de recién nacidos,²⁸ durante la fase folicular del ciclo menstrual,^{29,30} y algunas horas después de la ingestión de alimentos o de glucosa,^{31,32} aunque también se observa después de 72 horas de ayuno en individuos obesos hiperinsulinémicos.³³

Una disminución del número de receptores concomitante con aumento en la afinidad por la insulina, como se encontró en este estudio en algunos diabéticos post-pancreatitis, también se ha observado en la uremia,³⁴ en la acromegalia,³⁵ en el síndrome de Werner⁴ y en algunos casos con insulinoma³⁶. Excepto grados variables de resistencia a la insulina, no hay otras condiciones comunes y no existe una explicación clara ni única. En los insulinomas, la hiperinsulinemia puede ser la responsable de la disminución en el número de

receptores, mientras que el aumento en la afinidad podría explicarse por ingestión de alimentos más frecuente para prevenir las hipoglucemias. En los acromegálicos, tanto la disminución del número de receptores como el aumento de la afinidad estuvieron en relación con mayores de niveles séricos de insulina y de hormona de crecimiento.³⁵ La deficiencia de la hormona de crecimiento, en animales de experimentación, produce los cambios contrarios.⁴ En este estudio no se midió la hormona de crecimiento, por lo que no se puede excluir que algunas modificaciones de esta hormona pueden influir en los resultados. En los diabéticos postpancreatitis la secreción de glucagon esta disminuida, aún en respuesta a la arginina endovenosa.¹⁵

La presencia de hiperglucemia con hiperinsulinemia en los pacientes con diabetes postpancreatitis sugiere cierta resistencia a la insulina. Esta no correlacionó individualmente con el número de sitios receptores por eritrocito ni con su afinidad, por lo que es probable que la resistencia a la insulina se deba también a otros mecanismos; un paciente tenía concentraciones séricas altas de anticuerpos antiinsulina, pero éstos no se demostraron en otros cuatro pacientes en los que se determinaron. La resistencia a la insulina también se ha encontrado en diabéticos tipo I.³⁷ Nosadini y col.¹⁵ demostraron que los individuos con diabetes consecutiva a pancreatocetomía o a pancreatitis crónica tienen mayor sensibilidad a la insulina que los diabéticos tipo I.

El menor peso corporal parecería correlacionar con los hallazgos de este estudio. No hemos encontrado informes del estado de los receptores de insulina en la desnutrición, salvo en la debida a anorexia nervosa.^{4,7} En ésta, se encuentra aumento en la capacidad de unión por aumento del número de los receptores, sin cambios importantes de la afinidad. Estos datos son diferentes de los pacientes desnutridos con diabetes postpancreatitis.

La diabetes postpancreatitis difiere de los otros tipos de diabetes en la patogenia, en la destrucción de otras células pancreáticas, además de las beta, en la disminución de la función exócrina y de la producción de varias hormonas, en los requerimientos de insulina y en la poca frecuencia de coma diabético,^{38,39} así como mayor sensibilidad a la insulina.¹⁵ En este estudio se encontró que unos individuos con diabetes post-pancreatitis tienen aumentada la capacidad eritrocitaria para unir a la insulina, por mayor afinidad de los receptores a la hormona, aunque el número de sitios receptores por eritrocito está disminuido. La explicación de estos hallazgos es aún incierta, pero probablemente participan múltiples factores tales como la desnutrición, la administración de insulina exógena y tal vez la disminución de otras hormonas pancreáticas que intervienen en la regulación de los glúcidos.

Referencias References

1. CUATRECASAS, P.: *Insulin-receptor interactions in adipose cells: direct measurement and properties*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971; 68:1264.
2. FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M.: *Insulin receptors in the liver: specific binding of (¹²⁵I) insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971; 68:1833.
3. GAVIN, J.R III; ROTH, J.; JEN, P.; FREYCHET, P.: *Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1972; 69:747.
4. GRUNBERGER, G.; TAYLOR S.I.; DONS R.F.; GORDEN P.: *Insulin receptors in normal and disease states*. Clin. Endocrinol. Metab., 1983; 12:191.
5. JACOBS, S.; CUATRECASAS, P.: *Insulin receptor: structure and function*. Endoc. Rev., 1981; 2:251.
6. SCHISSINGER, J.; SHECHTER, Y; WILLINGHAM M.C.; PASTAN, I.: *Direct visualization of binding, aggregation, and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978; 75:2659.
7. KAHN, C.R.: *The molecular mechanism of insulin action* Ann. Rev. Med. 1985; 36:429.
8. POLLET, R.J.: *Insulin receptors and action in clinical disorders of carbohydrate tolerance*. Amer. J. Med. 1983; 75(Suppi 58): 15.
9. PEDERSON, O.: *Studies of insulin receptor binding and insulin action in humans*. Dan. Med. Bull. 1984; 31:1.

10. KAPLAN, J.A.: *The insulin receptor*. J. Pediat. 1984; 104:327.
11. KOLTERMANN, O.G.; SCARLETT, J.A.; OLEFSKI, J.M.: *Insulin resistance in non-insulin dependent, type II diabetes mellitus*. Clin. Endocrinol. Metab. 1982; 11:363.
12. OLEFSKY, J.M.; KOLTERMANN, O.G.: *Mechanisms of insulin resistance in obesity and noninsulin dependent (type II) diabetes*. Amer. J. Med. 1981; 70:151.
13. LOCKWOOD, D.H.; AMATRUDA, J.M.: *Cellular alterations responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes mellitus*. Amer. J. Med. 1983; 75:(suppl 5 B): 23.
14. PEDERSON, O.; BECK-NIELSEN, H.; SCHWARTZ S RENSEN N.; SVEJGAARD A.: *Heterogeneity of insulin receptors in patients with untreated insulin dependent diabetes mellitus*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1982; 55:30.
15. NOSADINI R.; DEL PRATO S.; TIENGO A.; DUNER E.; ET A.L.: *Insulin sensitivity, binding, and kinetics in pancreaticogenic and type I diabetes*. Diabetes 1982, 31:346.
16. GAMBHIR, K.K.; ARCHER, J.A.; BRADLEY, C.J.: *Characteristics of human erythrocytes insulin receptors*. diabetes 1987; 27:701.
17. MOORE, GE.; ITO, E.; ULRICH, K.; SANDERBERG, A.A.: *Culture of human leukemia cells*. Cancer 1966; 19:713.
18. DE MEYTS, P.; ROTH J.: *Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis*. Biochem. Biophys Res. Comm. 1975; 66:1118.
19. DONA, RF.; RYANJ.; GORDEN, P.; WACHSLICHT-RODBARD, H.: *Erythrocyte and monocyte insulin-binding in man. A comparative analysis in normal and disease states*. Diabetes 1981; 30:896.
20. PRAGER, R.; SCHERNTHAGER, G.: *Comparison of insulin receptor binding to monocytes and erythrocytes in newly diagnosed type II diabetes mellitus*. Horm. Metab. Res. 1982; 14:561.
21. CAMAGNA, A.; DE PIRRO.; TARDELLA, L.; ROSSETTI, L.; E.T.; A.L.: *Red blood cell age, pyruvate kinase activity, and insulin receptors*. Diabetes 1983;32:1017.
22. GINSBERG, BH.; BROWN, T.J.: *Regulation of insulin receptors in erythroid cells*. Metabolism 1982: 31:728.
23. OLEFSKI, J.M.: *Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese subjects*. J. Clin. Invest. 1967; 57:1165.
24. RIZKALLA, SW.; LE BOUC, Y.; SEROG. P.; APFELBAUM, M.: *Carbohydrate intake affects insulin binding to human erythrocytes in normal weight subjects but not in subjects with family obesity*. Metabolism 1981; 30:900.
25. TAYLON, A.; BLACKARD, W.G.: *Role of insulin receptors in obesity-related diabetes*. Horm. Metab. Res. 1982; 14:623.
26. DE MEYTS, P.; ROTH, J.; NEVILLE, DM.; GAVIN, JR.; LESNIAK, M.A.: *Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1973; 55:154.
27. DE MEYTS, P.; BIANCO. R.; ROTH, J.: *Site-site interactions among insulin receptors. Characterization of the negative cooperativity*. J. Biol. Chem. 1976; 251:1877.
28. HENDRICKS, A.; LIPPE, BM.; KAPLAN, SA.; LANDAW EM et al.: *Insulin binding to erythrocytes of normal infants, children, and adults: variation with age and sex*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1981; 52:969.
29. DE PIRRO, R.; FUSCO, A.; BERTOLI, A.; GRECO, AV.; LAURO R.: *Insulin receptors during the menstrual cycle in normal women*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1978; 47:1387.
30. DE PIRRO, R.; FORTE, F.; BERTOLI, A.; GRECO, A.; LAURO R.: *Changes in insulin receptors during oral contraception*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1981; 52:29.
31. MUGGEO, M.; BAR, RS.; ROTH, J.: *Change in affinity of insulin receptors following oral glucose in normal adults*. J. Clin Endocrinol Metab. 1977; 44:1206.
32. BERTOLI, A.; DE PIRRO, R.; GRECO, AV.; FUSCO, A.; ET AL.: *Response of insulin receptors to oral glucose in normal subjects*. J. Endocrinol. Invest. 1980; 3:59.
33. BAR, RS.; GORDON, P.; ROTH, J.; WAHN, C.R.; DE MEYTS, P.: *Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients. Effect of starvation, refeeding, and dieting*. J. Clin. invest. 1976; 58:1123.
34. GAMBHIR, KK.; ARCHER, JA.; NERURKAR, SG.; CRUZ, IA.; SANDERS, M.: *Erythrocyte insulin receptors in chronic renal failure*. Nephron 1981; 28:4.
35. MUGGEO, M.; BAR, RS.; ROTH, J.; KAHN, CR.; GORDON, P.: *The insulin resistance of acromegaly: evidence for two alterations in the insulin receptor on circulating monocytes*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979: 48:17.
36. BAR, RS.; GORDEN, P.; ROTH, J.; SIEBER, T. C.W.: *Insulin receptors in patients with insulinomas*:

- changes in receptor affinity and concentration. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1977, 44:1210.
37. DE FRONZO, RA.; HENDLER, R.; SIMONSON, D.: *Insulin Resistance is a prominent feature of insulin—dependent diabetes. Diabetes* 1982; 31:795.
38. BANK, S.; MARKS, IN.; VINIK, A.I.: *Clinical and hormonal aspects of pancreatic diabetes. Am. J. Gastroenterol.* 1975; 64:13.
39. DELLWYLER, W.: *Le diabète des pancreatopathies. Sem. Hosp. Paris* 1964; 40:1676.