

T.O.
H/2

ACTIVIDAD INSULINICA Y PROINSULINICA PLASMATICA EN LA
CIRROSIS HEPATICA E INFLUENCIA DEL CORTISOL Y HORMONA
DE CRECIMIENTO SOBRE SU INSULINRESISTENCIA.

Emilio Herrera Justiniano.

R. 8. 63f





ANTONIO AZNAR REIG, Catedrático de Patología y Clínicas Médicas de la Facultad de Medicina de Sevilla.

CERTIFICA: Que Don Emilio Herrera Justiniano, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección en la Facultad de Medicina de Sevilla, el presente trabajo sobre: "Actividad insulínica y proinsulínica plasmática en la Cirrosis hepática e influencia del Cortisol y Hormona de Crecimiento sobre su insulín-resistencia," por el que aspira al grado de Doctor.

Antonio Reig
Sevilla a 7 de Septiembre de 1.972

"Un hombre subió a un monte
y al llegar contempló al otro lado -
otro monte y al otro lado otro monte
mayor que el anterior."

Canción del Folklore madrileño.

A mi Profesor y Maestro

D. Antonio Aznar Reig.

Desde la primera página de este trabajo, nuestro mas profundo agradecimiento a todos aquellos que nos han ayudado en su realización.

- Dra. Milagrosa Díaz Galvez, por su efectiva colaboración desarrollada a nuestro lado día a día en todas las etapas de éste estudio.

- Dr. Eduardo Zamora Madaria a cuyo lado adquirimos las bases fundamentales y el rigor necesario que exige el Laboratorio.

- Dr. Blas Rodriguez de Quesada, pues siempre pudimos disponer tanto de sus instalaciones y material radioisotopico, como de sus consejos y ayuda personal.

- Prof. Losada Villasante - Cátedra de Biología (Facultad de Ciencias de Sevilla). En su laboratorio amablemente ofrecido, hemos desarrollado algunas de las etapas de nuestro estudio.

- Dr. A. Paneque Guerrero (Prof. Adjunto de la Cátedra de Biología) por sus consejos y ayuda, con sacrificio de su tiempo, en el aprendizaje de técnicas y manejo de aparatos.

- Dra. Esperanza Lázaro , Cátedra de Fisiología (Prf. Tamarit, Madrid) nos suministró Proinsulina porcina que tan precisa le es para sus propias investigaciones.

- Dr. Algaba Moreno, por las determinaciones de glucemia desarrolladas en el laboratorio que él dirige.

- Dres. Fernández Sanz y Trujillo Rodríguez. Ambos nos facilitaron los pacientes cirróticos hospitalizados en la Sala Amor de Dios (Prof. Aznar Reig).

- Dra. Concepción Marchante Serrano - Cátedra de -
Pediatría (Prof. Suarez Perdiguero) A ella debemos el desarrollo cromatográfico de aminoácidos plasmáticos.

- Dres. Serrera Contrera y Vaquero Ruiz. Departamento de Laboratorio (Ciudad Sanitaria Virgen del Rocío), -
pues nos hicieron posible la lectura densitométrica de las cromatografías de aminoácidos plasmáticos.

- Dres. Fernando Recio y Fernando Villamil - Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Sevilla --
(Prof. Mir Jordano), por facilitarnos las ratas necesarias en nuestra experiencia, ayudándonos posteriormente en la obtención de los tejidos utilizados.

- Dr. Díaz de Iraola, en cuyo servicio de la Cruz Roja de Sevilla, nos fuera permitido el desarrollo de los procesos de liofilización que tan importantes resultaron -
en la obtención de la ~~Profesora~~ ^{Proteína} muscular de rata.

- CAPITULO I.- Introducción y planteamiento de la hipótesis de trabajo.
- CAPITULO II.- Material y fundamentos de las técnicas utilizadas. Estudio de las mismas y "modus faciendi".
- CAPITULO III.- Lectura e interpretación comparativa de los resultados obtenidos.
- CAPITULO IV.- Comentarios sobre los resultados obtenidos.
- CAPITULO V.- Conclusiones.
- CAPITULO VI.- Bibliografía.

C A P I T U L O I

Introducción y planteamiento de la hipótesis de trabajo.

El papel fundamental del hígado en el metabolismo de los hidratos de carbono, se inicia con SOSKIN y cols.(1) en 1934, que pancreatectomizaron perros y sustituyeron el aporte de inulina del pancreas, por una bomba de perfusión intravenosa - con cantidad constante de insulina y les administró una sobrecarga de glucosa, y los animales no presentaron una curva de glucemia diabética sino normal. A otro grupo de perros normales, se les extirpó el hígado, y se les aportó una cantidad de glucosa constante endovenosamente, y su pancreas normal podía aportar toda la insulina que fuera precisa; presentaba a pesar de ello curvas de glucemias diabéticas. Fue aclarado de finitivamente por SOSKIN y cols. (2) en 1938, el papel homeostático del hígado en la glucemia, cuando experimentalmente y por perfusión hepática, determinó la cantidad de glucosa en la sangre que entraba y salía de este órgano; y comprobaron que el hígado está vertiendo glucosa a la sangre, cuando se administra ésta, empieza a retener glucosa; llega un momento en que el hígado ni la retiene ni expulsa, y pasado éste vuelve a verter glucosa en la sangre, y la glucemia que en el período de inhibición había bajado de las cifras normales se -- eleva ligeramente sobre su nivel.

- - - - -

A partir de entonces se ha intentado comprender la intimidad de estos fenómenos, en que sabemos intervienen no solo el substrato-glucosa-glucógeno, sino diversas enzimas y hormonas.

En el balance (suma de aportaciones y salidas, gluconeogenesis y glucolisis etc.) vamos a considerar las siguientes facetas, a fin de comodamente poder tener una idea sintética de conjunto.

- I) Glucosa fácilmente retirada y vertida a la sangre.
- II) Funciones de almacenamiento:

- 1) Glucógeno. Glucogenogesis y glucogenólisis.
- 2) Lipogenesis.

III).- Otros factores de destrucción y aporte de glucosa a tener en cuenta:

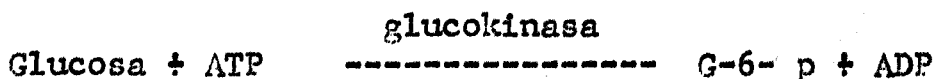
- 1) Glucolisis y gluconeogenesis.
- 2) Oxidación de la glucosa, que aporta la total - - energía para las biotransformaciones.
- 3) Otras vías metabólicas:
 - a) Vía oxidativa de las pentosas ("shunt" de las pentosas).
 - b) Vía de los glucuronidatos.

De la reciente revisión muy completa de LEVINE y HAFT -- (3) tomamos algunos de los datos que se exponen.

I.- Glucosa fácilmente retirada y vertida a la sangre.

a) Cuando un aporte de glucosa llega al hígado, a partir del intestino por la vía portal, dicha sustancia penetra en la célula hepática sin limitación, su concentración en el agua celular y extracelular es la misma. Simultáneamente la glucosa en el intestino ha puesto en marcha la liberación de hormonas intestinales (glucagón simil, secretina, gastrina, pancreocimina, y de un supuesto factor humoral todavía desconocido) que induce la liberación de insulina por el pancreas.

El primer paso metabólico, que es limitante, es la fosforilización de la glucosa a glucosa-6-fosfato (G-6-P), por acción de una glucokinasa (cuyo contenido en el hígado es de 180aa 360 ml %).



b) Cuando desciende la glucemia, hay una salida de glucosa del hígado por las siguientes circunstancias:

- 1) Disminuye el ritmo de fosforilización.
- 2) La glucosa deriva de la G-6-P por acción de una enzima específica G-6-Pasa la salida de glucosa calculada con glucosa marcada, oscila entre 110 y 225 ml./por Kg./h. que viene a ser de 8 a 16 grs. de glucosa por hora en el hombre adulto (4).
- 3) Hormonalmente se produce una elevación de glucagón y - y de H.G.H.

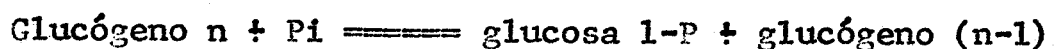
II.- Funciones de depósito.

1) Glucógeno. Glucogenogenesis. Glucogenolisis.

El glucógeno, es un gran polímero de glucosa (peso molecular entre 1-5 millones), su estructura asemeja a un árbol, está formado por restos de - glucosa con dos tipos de enlaces entre los glucosidos, 1:4 y 1:6; el enlace predominante es 1:4 y en los puntos de ramificación hay menores 1:6 (fig.a).

a) Glucogenolisis.

Dos enzimas están involucradas en la ruptura del glucógeno: la fosforilasa que ataca los enlaces 1:4 de la parte más externa de las ramas terminales, que pueden ser transformadas a un fosfato inorgánico y formar así, -glucosa-1-fosfato (G-1-P).



Esta fosforilasa en su forma activa es una fosfoproteína, que es inactivada si se le quitan sus grupos fosfato, y una - kinasa cataliza la fosforilización de la proteína (y por ello pasa de la forma inactiva a la activa) (fig. c). A su vez la - kinasa es activada por el monofosfato cíclico de adenosina - - (CAMP), el cual se produce a partir de ATP por la adenil cicl_{asa}.

b) Glucogenogenesis.

Es el proceso opuesto al anterior, por la adición de residuos de glucosa por enlaces 1:4 que es catalizada por la -

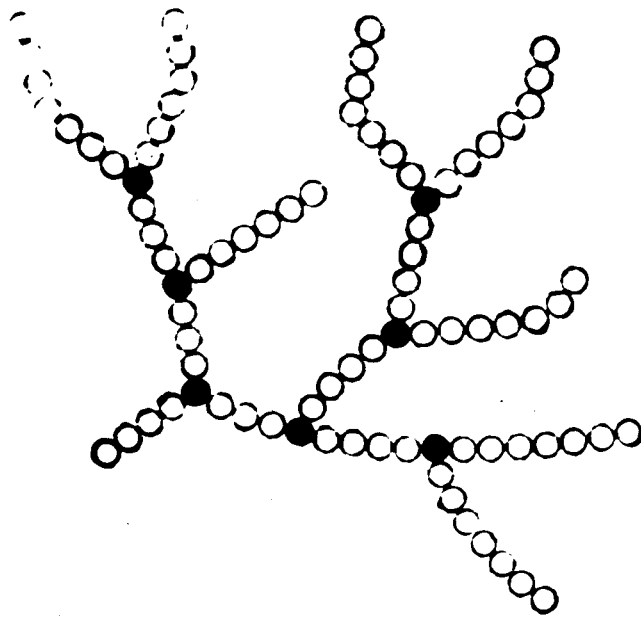


FIG. 9-6. Estructura del glucógeno. ○, restos de glucosa unidos por los carbonos 1 y 4; ●, puntos de ramificación con uniones en los carbonos 1, 4 y 6.

FIG. a

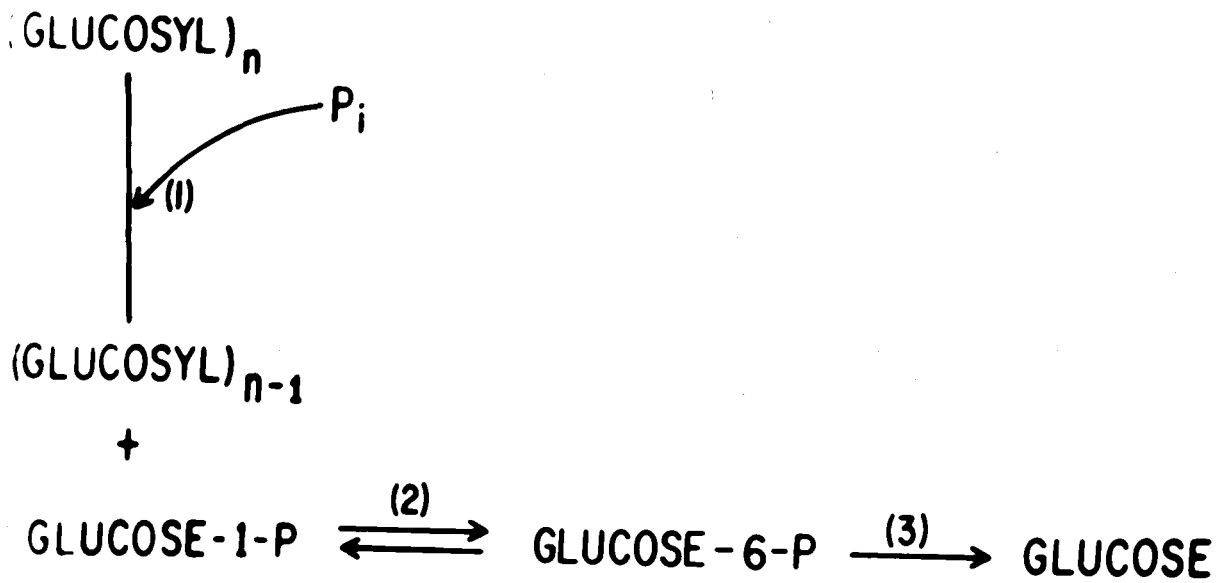


FIG. b

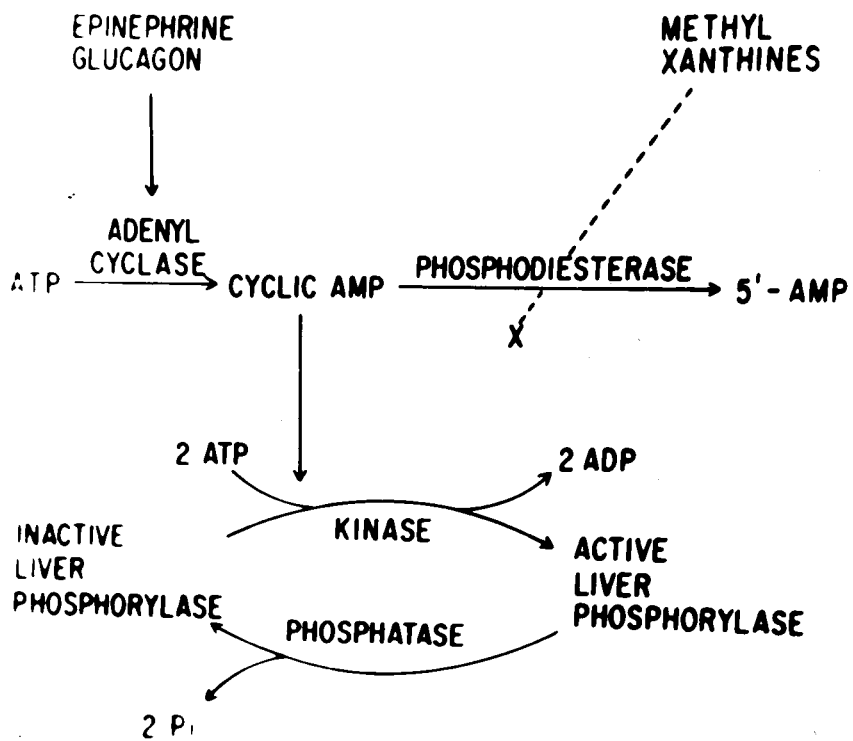


FIG. c

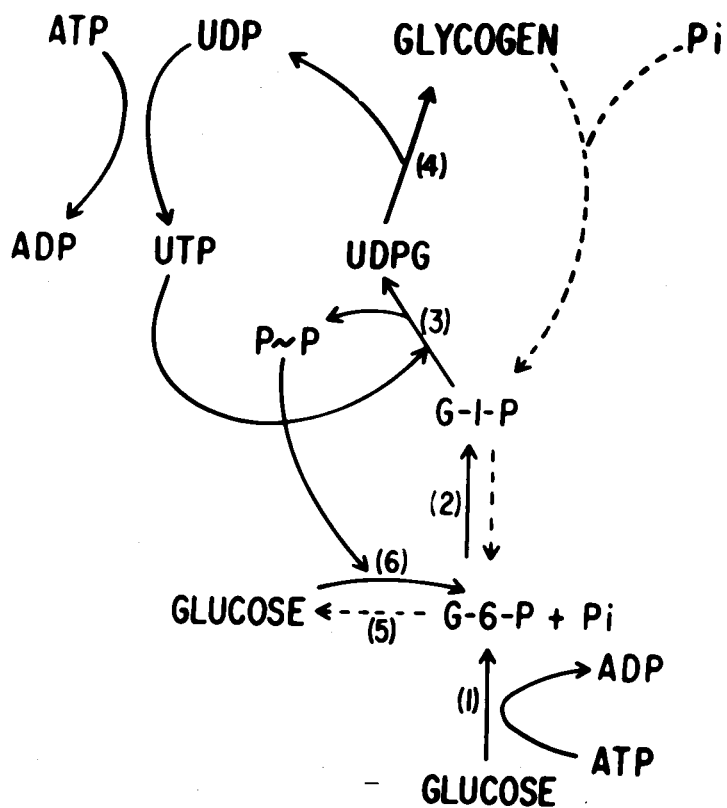


FIG. d

glucogen-sintetasa (que es mas activa cuando ha perdido sus grupos fosfato, y se inactiva cuando se fosforiliza) La incorporación de glucosa a glucógeno, es de 40 veces más grande que en el control pasados los primeros cinco minutos (fig. d).

La insulina favorece la glucogenosíntesis.

SHOEMAKER (5) ha calculado que solo el 27% de la glucosa absorbida en el intestino y depositada en el hígado lo hace como glucógeno, y el resto sirve para reemplazar la salida de glucosa de éste, de 180 ml./Kg./h.

2) Lipogenesis.

En el organismo hay dos sistemas celulares capaces de -- transformar la glucosa en ácidos grasos: el hígado y el adiposito.

Ya conocemos bastante bien el proceso lipogénico:

- a) El piruvato es oxidado a Acetyl Co A.
- b) Acetyl Co A fija un CO_2 y se transforman en malonil Co A.
- c) El malonil Co A. fija un CO_2 que después es perdido en subsiguientes condensaciones y reducciones para llegar finalmente al ácido palmítico. El H extra necesario es provisto por el N.A.D.P.H., que se libera en el llamado "ciclo de las pentosas" del metabolismo del G-6-P.
- d) Los ácidos grasos son esterificados por el alfa-glicerofosfato, y se forman triglicéridos (los cuales son transportados del hígado en forma de lipoproteínas por la sangre al tejido adiposo, donde una lipasa lipoproteínica los destruye y reesterifica al triglicérido - dentro de la célula hepática (JEANRENAUD (7)).

III.- Otros factores en el balance hidrocarbonado hepático.

Pero no solamente la salida y entrada de glucosa en el hígado dependen de estos factores sino que existen otros

tales:

1) Glucolisis y gluconeogenesis:

Glucolisis.- Es la serie de transformaciones que conducen a la G-6-P a piruvato lactato o ambos (fig. f). El piruvato es entonces descarboxilado oxidativamente a Acetyl-Co-A, la cual puede llegar a ser transformada en CO_2 y H_2O ; polimerizada a largas cadenas de ácidos grasos; o transformada en aceto-acetato; esta dirección desintegrativa es irreversible.

Gluconeogenesis.- Se sabe desde hace años que el hígado es capaz de sintetizar glucosa a partir de los substratos: lactato, piruvico, glicerina, ácidos dicarboxílicos, aminoácidos y cadenas de ácidos grasos; y esto se lleva a cabo por una serie de enzimas y así tenemos:

- a) Que una fosfatasa específica produce fructosa-fosfato (F-6-P) a partir de F 1: 6 P asa.
- b) La fosfoenolpiruvato carbokinasa (P.E.P.) cataliza el paso irreversible P:E.P.====oxalacetato, y sirve para transformar en glucosa cualquier sustancia que entrando por la vía porta llega a ser transformada en oxalacetato.
- c) Aminoácidos como la alanina y también los lactatos pueden entrar en estas vías gluconeogénéticas.
- d) Favorecen estas gluconeogenesis la abundancia de substratos, cuando la glucosa falta en los alimentos, tales como: ácidos grasos y aminoácidos.

En esta gluconeogenesis es muy importante la acción del CAMP (EXTON Y PARK) (6), cuyos niveles son descendidos por la insulina y altera por estos cuatro caminos:

- Incrementando el catabolismo proteico hepático o aminoácido.
- Incrementando la lipolisis intrahepática.

- Dando estímulo adicional a la formación de PEP a partir de oxalato, independiente de incrementar acetyl-Co-A.
- Incrementando la entrada de aminoácidos glucogénicos dentro del hígado.

2) Oxidación.

Es la destrucción de glucosa hasta llegar a CO_2 y H_2O . Tiene lugar por el camino: Piruvato --- Ac Co A --- CO_2 en el ciclo de KREBS, ya que tiene que favorecer todos los requerimientos de energía para los otros metabolismos; pero a pesar de ello, es de escasa cuantía, alrededor de 3 gr. de glucosa/h. en la fase activa de absorción de glucosa.

3) Hay otros caminos de transformación de la glucosa que son también importantes para el hígado tales:

- Via oxidativa de los monofosfatos dehexosa, que genera N.A.D.P.H. , el cual se utiliza en las síntesis de ácidos grasos.
- Via de los glucuronatos, vital para la formación de los glucoronidos (que son precios para el metabolismo de la bilirrubina, conjugación e inactivación de esteroides, y de toxicación de ciertas sustancias ingeridas extrañas al organismo.

- - - - -

Sirva lo anteriormente expuesto, como una breve pincelada del importante papel jugado por el hígado en la regulación del metabolismo hidrocarbonado, que forzosamente debe modificarse cuando el funcionamiento de dicho órgano se altera de forma importante.

La cirrosis hepática es una afección evolutiva, que a la destrucción hepática, tanto anatomopatológica como de los sistemas metabólicos de dicho órgano. Y así teóricamente, era lógico pensar que bien directa o indirectamente surgiera la altera

ción hidrocarbonada en un determinado momento de su evolución.

Dicha hipótesis se ve confirmada en el acontecer clínico cotidiano, y así han sido muchos los trabajos que han intentado aportar resultados a la relación: Intolerancia Hidrocarbonada-Cirrosis hepática. Pero al consultar la bibliografía, nos encontramos que la mayoría de los autores, con metódicas diversas, criterios diferentes y también con distinto material de observación, han estudiado el problema desde dos ángulos - completamente diferentes:

- a) Alteraciones del hígado en la intolerancia hidrocarbonada.
- b) Intolerancia hidrocarbonada que aparece en el curso - de las hepatopatías crónicas evolutivas.
- a) Alteraciones del hígado en la intolerancia hidrocarbonadas.: Es muy conocido desde antiguo la asociación del hígado graso y diabetes, siendo la lesión hepática secundaria a la disregulación hidrocarbonada. Ahora bien, la esteatosis hepática aparece fundamentalmente en diabéticos de edad madura, obesos, por lo - que en algunas estadísticas parece comprobarse, que - el hígado graso, es mas bien tributario de la obesidad.

Otra afección que ha llamado la atención en este sentido, ha sido la hepatitis vírica, y estudios recientes demuestran que es más frecuente en diabéticos, que en la población normal, SEIGE y cols. (8) y (9).

Y si bien JENSON (10) muestra algo similar en los pacientes de la clínica Jeslin; presenta datos en los que dicha frecuencia va disminuyendo en los últimos diez años.

Con respecto a la frecuencia de aparición de la cirrosis hepática en diabéticos; el mismo autor anteriormente citado, - encuentra que entre los años 1958 a 1965, se ha incrementado a 0'90% mientras que era solo de 0'40% entre 1941 a 1950, y de -

y de 0,78% entre 1951 a 1958. Claró está que ello puede ser - reflejo del aumento de la cirrosis hepática en la población - general, de la cual como es lógico, la población diabética cons- tituye una parte.

b) No obstante a nuestro juicio, resulta mucho más interesan- te el estudio de la Intolerancia Hidrocarbonada que "apare- ce" en el curso evolutivo de las hepatopatias crónicas, y fundamentalmente en la Cirrosis hepática.

Y en este campo ya estamos muy lejos de aquellas afir- maciones pintorescas, basadas en datos empíricos tales como - aquellos entre otros: "a medida que se va instaurando una ci- rrosis hepática, va mejorando la diabetes Mellitus", ya que - desgraciadamente no es así, pues no solo ésta no mejora, sino que los autores que en la actualidad se han preocupado del es- tudio de este problema, encuentran en sujetos cirróticos sin el menor antecedente diabético, que la proporción de Intole- rancia hidrocarbonada, es extraordinariamente elevada.

Bien es verdad, que resulta muy difícil "standardizar" - los resultados obtenidos por los diversos autores, ya que al utilizar diferentes criterios clasificatorios, la población - no resultaría homogénea; pero de todas formas, llama la aten- ción, que un problema tan importante, dado el elevado número de sujetos afectos, y el aumento de la supervivencia que día a día se va consiguiendo en tales pacientes, haya sido tan poco estudiado en los últimos años. Y que ello es así, lo demuestra la carencia de criterios existentes en cuanto a clasificación etiopatogenica y analítica se refiere.

Muchas preguntas quedan en la actualidad sin contestar y creemos que sobre ellas deberían de concentrarse los esfuer- zos:

- 1- ¿ Lo que presenciarnos son auténticas diabetes Mellitus?
- 2- ¿ Cual es el patrón de secreción de Insulina en dichos pacientes?
- 3- ¿ Juegan algún papel los factores gastrointestinales, que influyen sobre la secreción insulínica?
- 4- ¿ La insulina segregada por el pancreas del Cirrótico, presenta la misma actividad biológica, que aquella puesta en circulación en el sujeto normal?.
- 5- ¿ Existen determinados factores ajenos al pancreas endocrino, que modifican la respuesta de este al estímulo? Y si es así:
- 6- ¿Cuales son?
- 7- ¿Son tisulares o plasmáticos?

Algunos autores han estudiado parte de estas interrogantes señaladas, si bien otras están todavía sin respuesta, - mas no ofrecemos en esta primera parte un resumen de lo encontrado hasta ahora, pues creemos mas interesante hacerlo en el capítulo de los COMENTARIOS, para de esta forma, confrontar - con ellos nuestros resultados y evitar de esta forma repeticiones tediosas.

Así pués, y a modo de resumen de las cuestiones anteriormente planteadas, es necesario identificar el patrón, si es que existe, de la intolerancia hidrocarbonada, para de esta forma poderlo comparar con aquellos definitorios de otros tipos de intolerancia ya conocidos entre los cuales figuran:

I- INTOLERANCIA HIDROCARBONADA INFANTO-JUVENIL.

Caracterizada por un déficit de la capacidad secrecional de la célula β pancreática, puesta de manifiesto en situación basal, y ante distintas pruebas estimulativas.

II - INTOLERANCIA HIDROCARBONADA DE LA MADUREZ.

Igualmente en ellas, aparece un déficit de liberación de insulina, aunque de grado menor. En situación basal, a veces, ya es objetivable la intolerancia, otras veces se requieren pruebas de estimulación, para poner de manifiesto la claudicación pancreática.

En determinados casos los niveles de insulinemia considerados de forma absoluta, son idénticos a aquellos apreciados en los sujetos normales, requiriéndose determinados índices - que relacionen la insulinemia obtenida con el grado de estímulo que la originó SELTZER (11); PERLEY Y KIPNIS (12).

III - INTOLERANCIA HIDROCARBONADA DEBIDA A SECRECIÓN DE PROINSULINA.

Cuando muestras de plasma y orina humana, se pasaron por una columna de gel (Sephadex G-50), se obtuvieron dos picos de material inmunológicamente reactivo. RUBENSTEIN, (14)". Cita B

Posteriormente, el primer pico que al principio recibió - el nombre de "Big" Insulin, fue identificado como Proinsulina (CHANCE)(15) , siendo el segundo pico, la Insulina.

La proinsulina, precursor de cadena única de insulina, fue descubierto en 1.965, durante estudios de la biosíntesis de la insulina "in vitro", usando "slices" de adenomas de células β pancreáticas, STEINER y OYER (16).

Posteriores estudios en islotes normales de ratas, ofrecieron las evidencias quinéticas necesarias, para establecer - las interrelaciones de Proinsulina e insulina. STEINER y cols. (17).

Este péptido, mayor de la insulina, se ha mostrado como - el precursor biosintético de la insulina, de ahí su nombre; siendo la síntesis de la proinsulina, como péptido lineal; presumiblemente la que facilita posteriormente el establecimiento -

de los enlaces disulfuros. Pero el hallazgo en plasma, de un material que debería estar según la función sospechada, en el interior de la célula β pancreática, plantea diversas interrogantes acerca de su papel biológico, incluyendo su posible conversión extrapancreática a insulina, e interacción con la insulina a nivel de los receptores periféricos.

Más nuevos datos de interés aparecieron, cuando al estudiar la actividad biológica de la proinsulina, se pudo comprobar sobre una base de idéntico peso, como presentaba también solo de un 10 a un 20% de la actividad de insulina en los distintos tejidos "in vitro" SHAW (18) y KITABCHI (19)...

Otra propiedad interesante surgió, cuando se observó que la proinsulina presenta una reacción inmunológica cruzada con los anticuerpos antiinsulina (KITABCHI) (19); lo que permitía sospechar que una determinada proporción de la insulina inunorreactiva, podría corresponder a proinsulina. Efectivamente, ello fue comprobado por diversos autores, GOLDSMITH y cols. (20), MELANI y cols. (21).

La conjunción de los hallazgos experimentales expuestos, y la existencia en la clínica de una serie de pacientes portadores de cifras de insulinemia muy elevadas, relativas al estímulo, apuntaban la posibilidad de la secreción de una insulina poco eficaz que pudiera tratarse de proinsulina segregada en una alta proporción.

IV - INTOLERANCIA HIDROCARBONADA POR RESISTENCIA A LA ACCIÓN DE LA INSULINA.

Determinados pacientes, a pesar de presentar niveles de insulinemia similares a aquellos sujetos que desarrollan un metabolismo hidrocarbonado normal, presentaban intolerancia:

Debido a ello, se ha pensado, en la posibilidad de la existencia de una resistencia a la acción de la insulina.

Los factores que se han venido considerando como posibles responsables de dicho estado, incluyen:

- 1º) Factores hormonales.
- 2º) Substratos metabólicos o intermedios del metabolismo intermedio.
- 3º) Fracciones de proteínas séricas específicas, las cuales - pueden estar o no, bajo control endocrino.

Los citados factores, pueden inhibir directamente la acción de la insulina a nivel tisular, o bien interferir a través de una interrelación con la hormona, durante su secreción o transporte desde el páncreas a los distintos tejidos.

1º) Factores endocrinos.

Los factores endocrinos revisten el mayor interés, ya que pueden también condicionar los otros dos tipos de factores inhibitorios.

Más hay que tener en cuenta, que el estudio de su acción resulta extraordinariamente complejo, ya que es bien conocido en la realidad que la acción de una hormona, puede ser influenciada y alterada por la simultánea acción de otra; y que la acción endocrina incluye actividades de estimulación o frenación de unas glándulas con otras.

a) Hormonas hipofisarias.

I.- HOUSSAY y cols. (22), establecieron la actividad diabetogénica del lóbulo anterior de la hipófisis, siendo más tarde localizada, al menos con mayor extensión, en la HORMONA DE CRECIMIENTO HIPOFISARIA (KETTERER B) (23) y YOUNG(24).

Dicha hormona, origina intolerancia hidrocarbonada, que puede incluso establecerse de forma permanente; apareciendo entonces cambios degenerativos en los islotes pancreáticos. Esto puede ser prevenido junto con la intolerancia, por la administración de insulina HAIST (25). Estas observaciones su --

guieren , que la hiperglucemia, es una consecuencia primaria de la administración de extractos pituitarios, y que al imponer una excesiva demanda sobre la síntesis y liberación de - insulina, conduce a la extenuación de la célula β pancreática.

Estas primeras observaciones, han sido confirmadas, por las medidas de concentraciones de glucemia e insulinemia, -- tras la administración de preparaciones purificadas de HGH - tanto en sujetos normales como pacientes hipopituitarios. VARGAS (26).

Los actuales conocimientos de la acción metabólica de - la HGH KETTERER (23), RANDLE (27), IKKOS, (28) RABEN (29) - WEIL (30)..., sugieren que la actividad de mayor responsabilidad sobre la intolerancia hidrocarbonada, es la inhibición de la utilización de glucosa por el músculo y el tejido adiposo, inhibiendo el transporte de la glucosa, a través de la membrana celular YOUNG (31). Pero también la hormona ejerce una potente actividad movilizante de los ácidos grasos libres (F.F.A.) en el tejido adiposo "in vivo" RABEN (29) y bajo - ciertas circunstancias "in vitro", FAIN (32); el efecto sobre la utilización de glucosa por el músculo, puede ser secundario a un incremento de los niveles circulantes de F.F.A., según el concepto del ciclo: "glucosa-ácido-graso" de RANDLE - (33). Así pues, dos posibilidades pueden valorarse a este respecto: o bien un efecto primario de la hormona sobre la lipólisis en tejido adiposo, y quizás también en el muscular, (G. SCHONFELD) (34); o bien, primariamente sobre la utilización - de la glucosa en ambos tejidos, siendo la movilización de F. F.A. secundaria (RABINOWITZ)(35).

Realmente, para que la hormona de crecimiento pueda - jugar en el establecimiento de distintos cuadros de intolerancia, hay que buscarlo en la reciente caracterización de dicha hormona, como un agente agudo y dinámico regulador del metabolismo hidrocarbonado y graso (GLICK)(36), ROTH (37), ROTH(38).

y mediante el cual, pequeñas alteraciones en las relaciones de insulina y HGH, en respuesta a determinadas necesidades metabólicas, pueden conllevar importantes efectos.

II) La actividad diabetogénica de otros dos peptidos de la hipófisis anterior ACTH y TSH, es probablemente el resultado de la activación de sus respectivas glándulas dianas, aunque también pueden estar envueltas, efectos directos relacionados con su acción lipolítica (ENGEL, (39), HOR (40), LEBOVITZ (41)).

b) Glucocorticoides.

La actividad diabetogénica de los glucocorticoides adrenales, es tan ampliamente aceptada como la de la HGH.

I) En ausencia del cortex adrenal, existe una sensibilidad a la insulina incrementada; mientras que los hiperadrenocorticismos, tanto endógenos como exógenos, originan en clínica el síndrome caracterizado por Cushing, frecuentemente asociado con hiperglucemia, glucosuria, resistencia a la insulina exógena, una actividad "insulin-like" circulante elevada, en estado basal y tras sobrecarga de glucosa. KLINK (42).

La actividad diabetogénica de los glucocorticoides, parece estar primeramente relacionada con: la acelerada gluconeogénesis de aminoácidos y otros precursores (LONG (43), WAGLE (44), WAGLE (45), disminución de la utilización periférica de glucosa INGLE (46), INGLE (47) y también la estimulación de la movilización de los F.F.A. del tejido adiposo, JEANRENAUD (48)

FAIN (32). Si bien la administración de glucocorticoides en el hombre, disminuye la sensibilidad de la insulina, la disminución de la tolerancia a la glucosa solo se produce en algunos individuos, quizás en función de la capacidad del páncreas del sujeto explorado para aumentar la secreción de insulina.

Aparte del síndrome de Cushing, realmente no han sido descritos casos en los que se pueda sospechar con fundamento

que los niveles de glucocorticoides sean un factor patogenético de primer orden, no obstante es interesante la comprobación de las posibles influencias de las alteraciones dinámicas en sentido de desequilibrio insulinaglucocorticoides.

II) A nivel similar aunque mucho menor, figuran otras hormonas como: Adrenalina, glucagón, hormonas tiroideas y sexuales, pero como los indicios de su influencia son escasos, nos permitimos no incluirlas.

2a) Factores metabólicos.

Existen considerables evidencias tanto de experimentos "in vitro" WILLIAMSON (49) SHIPP (50) como "in vivo", en animales, FELTS (51), MEBANE (52) y en hombres FELBER (53) SCHALCH (54), que surgieron que los ácidos grasos libres, y los cuerpos cetónicos, originan en el músculo una disminución de la utilización de glucosa y de sensibilidad a la insulina.

La observación que en algunos tipos de intolerancia hidrocarbonada, los ácidos grasos libres, y los niveles de insulina inmunorreactiva estaban elevados, llevó a RANDLE y su grupo HALES (55) a sugerir, que un incremento primario en la tasa de movilización de tejido adiposo, y de otros tejidos de depósito podría ser la primera lesión de la diabetes en el hombre, RANDLE (56) (33), al resultar una disminución en la captación de glucosa por el tejido muscular, y una disminución de la sensibilidad a la insulina.

Dicha interpretación resulta muy interesante, aunque realmente difícil de demostrar, y todavía no ha podido objetivarse, que la lipólisis sea primaria y no secundaria, y que un estado de hiperinsulinemia crónico desarrolle un agotamiento pancreático.

39) Proteínas séricas específicas Anti-Insulina.

Si bien este apartado hace algunos años era objeto de gran atención, en la actualidad, los dos hallazgos que lo mantenían se encuentran muy en controversia. Así ANTONIADES y cols.(60),(61) surgieron que la insulina endógena está normalmente unida a una proteína sérica, y que su unión es mucho más intensa en algunos casos de diabetes. Dichas afirmaciones aun no han podido ser confirmadas.

Algo similar sucede en la sinalbumina de WALLECE-OWEN (57), (58), (59).

Planteamiento e Hipótesis de trabajo.

En un grupo de cirróticos, sin antecedentes personales ni familiares de Diabetes, y en avanzado estado evolutivo, nos propusimos estudiar:

1º) Porcentaje y grado de insuficiencia hidrocarbonada, en situación basal y tras sobrecarga de glucosa, tanto oral como intravenosa, esta última para eliminar el factor de absorción gastrointestinal.

2º) Niveles de insulinemia inmunorreactiva, basal y tras estimulación.

Las cifras obtenidas por análisis radioinmunológico, serían consideradas tanto en su valor absoluto, como relativo, al grado de estímulo (índice de SELTZER).

La dinámica insulínica de ambas pruebas, nos permitía estudiar indirectamente el comportamiento de las hormonas gastrointestinales con capacidad estimulativa de la liberación insulínica.

3º) Comparar los parámetros obtenidos en el grupo de Cirróticos con un grupo de Diabetes de Madurez.

4º) Actividad proinsulínica tras estímulo en los plasmas correspondientes al grupo de Cirróticos, y compararla con la obtenida con un grupo de sujetos normales (controles).

La medida directa de proinsulina en plasma, presenta gran dificultad, debido a la necesidad de obtener para ello un anticuerpo específico para proinsulina, que no reaccione con la insulina y el péptido C RUBENSTEIN (62).

Así pues, y debido a ello, la mayoría de los autores han utilizado las técnicas cromográficas (gel filtración), para separar la insulina de la proinsulina plasmática, valorando posteriormente ambas fracciones por análisis radioimpu

punológico ROTH (13) (14).

El descubrimiento de una enzima BRUSH (63), que degrada específicamente la insulina, pero no la proinsulina, ofreció la posibilidad de desarrollar un método directo para la medida de la proinsulina en plasma KITABCHI (64), Dicho método nos resultó extraordinariamente atrayente y fue el que decidimos utilizar para nuestras valoraciones. Pero para ello teníamos: 1º) Obtener la mencionada enzima, (proteasa de músculo esquelético de rata), 2º) intentar que su actividad fue se lo más elevada posible, y posteriormente, 3º) adaptarla a un sistema radioinmumológico utilizando "standard" de proinsulina. El único autor que ha utilizado este método KITABCHI (64) empleó insulina humana como "standard", mas en dicho sistema, al presentar mayor afinidad los anticuerpos antiinsulina por la insulina que por la proinsulina plásmatica, los valores de esta última resultan disminuidos.

La obtención de la enzima expuesta anteriormente, nos permitiría valorar Proinsulina plasmatica (ng/ml), el porcentaje que esta representa de las cifras obtenidas de insulina inmunorreactiva, y estudiar la correlación existente entre liberación de insulina y Proinsulina.

5º) Los niveles de cortisol plasmático (análisis de saturación) y hormona de crecimiento (análisis radioinmumológico), en situación basal, y antes las mencionadas sobrecargas orales e intravenosas de glucosa, con objeto de establecer las relaciones dinámicas entre insulina, HGH y cortisol, en el grupo control.

C A P I T U L O I I

Material y fundamentos de las técnicas utilizadas

Estudio de las mismas y "modus faciendi".

M A T E R I A L

I HUMANO.-

Para el desarrollo del presente estudio se eligieron los siguientes grupos de sujetos.

- 1) **Controles:** Trece, con edades comprendidas entre 25 y 40 años y un peso que oscila entre \pm 10% del peso teórico. Sin hallazgos patológicos anamnesicos ni exploratorios, con ausencia de historia familiar de diabetes y una respuesta normal al "test" oral de sobrecarga de glucosa.
- 2) **Diabéticos:** Seis, con edades comprendidas entre 30 y 45 años y un peso entre \pm 10% del peso teórico. Con respuesta anormal en sus tres parámetros a la sobrecarga oral de glucosa, existiendo en ellos antecedentes familiares de diabetes. Ninguno presentaba signos de descompensación clínica, ni cetosis, ni habían recibido tratamiento.
- 3) **Cirrósisis:** Catorce, con edades comprendidas entre 40 y 60 años y sus pesos oscilaban entre \pm 10% del peso teórico. Todos ellos estuvieron ingresados durante el periodo de pruebas, en la Salas Amor de Dios y Sta. Catalina Prof. Aznar Reig.

Su diagnóstico fue establecido por los hallazgos clínicos y los valores obtenidos por pruebas funcionales hepáticas, transaminasa G.O. y G.P., fosfatasa alcalina, bilirrubinemia, proteínas sericas totales y desarrollo electroforético de las mismas.

En cuatro de ellos se practicó punción biopsica para confirmar el diagnóstico. Todos presentaban signos evidentes de hipertensión portal. Doce de ellos eran portadores de cirrosis de LAENNEEC y dos de cirrosis postnecróticas.

Ninguno presentaba antecedentes familiares de diabetes ni habían sido diagnosticados anteriormente de dicha afección.

No se comenzó el tratamiento con diuréticos hasta haber concluido las exploraciones del presente estudio. Tras la sobrecarga de glucosa (oral e intravenosa) dicho grupo fue dividido en dos subgrupos, en función de la asimilación de los H.de carbono; y para ello valorar su anormalidad glucémica:

a) Cirróticos "normales".

Sobrecarga oral.- La suma del valor de glucemia alcanzada a la primera hora mas el valor en la segunda hora, - fue menor de 300 mg%. KOBBERLING (65).

Sobrecarga intravenosa.- Valor de Kg > de $1,4 \times 10^{-2}$ mg% minuto.

b) Cirróticos "diabéticos"

Sobrecarga oral .- mg% de la primera hora \pm mg% de la segunda hora > 300 mg %.

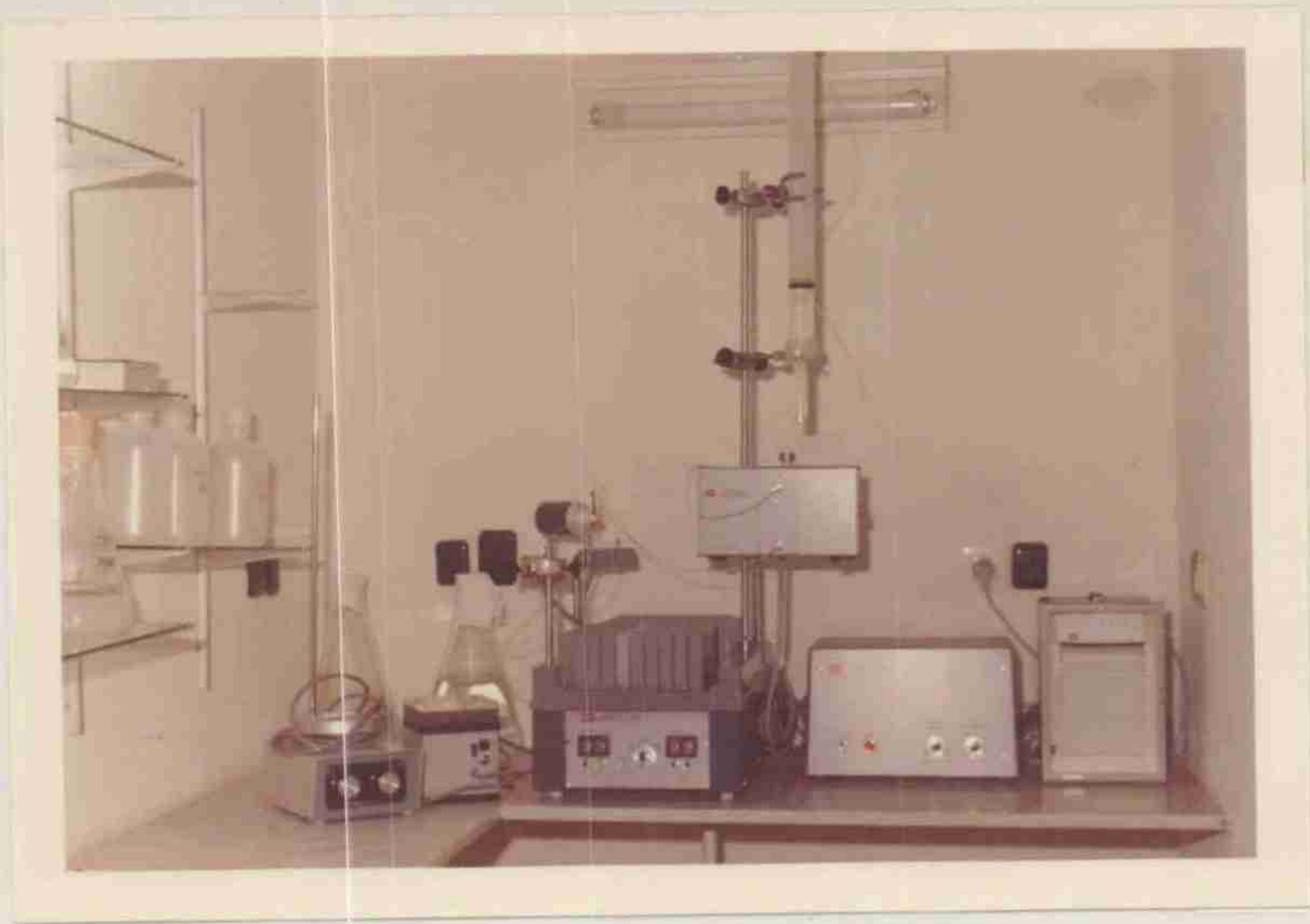
Sobrecarga intravenosa.- Kg < $1,4 \times 10^{-2}$ mg% minuto.

II. ANIMALES

Fueron utilizadas ratas machos Wistar de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Sevilla -- (Prof. Mir Jordano), Su peso fue de 120 - 160 gramos y tuvieron libre acceso a comida y agua hasta el momento de sacrificarlas.

Apartados utilizados

- 1) MIXTO-TUB GRICEL
- 2) Baño de incubación KOTTERMAN
- 3) Agitador magnético
- 4) Contador radiaciones de dos canales NUCLEAR CHICAGO (Dr. Rodriguez de Quesada).³
- 5) Contador centelleo NUCLEAR CHICAGO - UNILUX II (Catedra de Biología Prof. Losada) 4



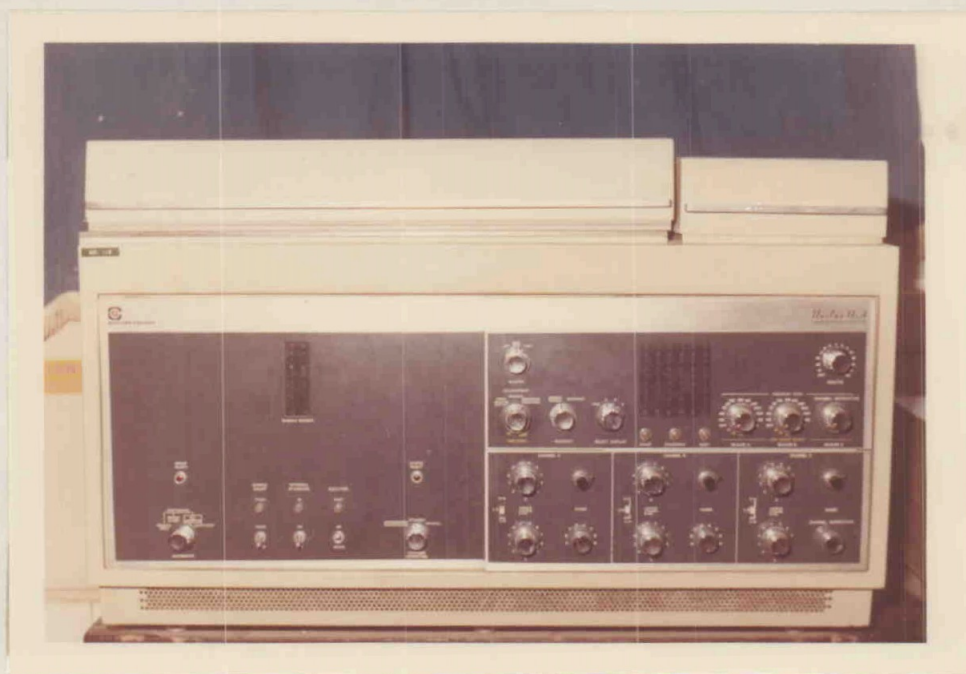
1



2



3



4

- 6) Camara fria 1
- 7) Colector de fracciones L.K.B.1
- 8) ULTRATURRAX
- 9) Ultracentrifuga SORVALLRC(Catedra de Biolog.Prf.Losada)
- 10) Ultracentrifuga L2 50 B - SPINCO - 2
- 11) Liofilizador (Centro de Donación de sangre de la Cruz Roja Española .Dr. Diaz de Iraola)
- 12) Espectrofotómetro BECKMAN (Prof. Losada)

Reactivos.

- Hormonas.

- Insulina humana (CEA-SORIN)
- Proinsulina porcina (Dr.CHANCE Lab.LILLY,Indiana polis) (1)
- Hormona de Crecimiento Humana (CSA-SORIN)
- Cortisol (CEA-SORIN)

- Hormonas marcadas isotópicamente.

- Insulina porcina I¹²⁵ (CEA-SORIN)
- Hormona de Crecimiento Humana I¹²⁵ (CEAN SORIN)
- Cortisol H³ (CEA-SORIN)

- Anticuerpos

- Anticuerpo anti-insulina porcina (cobaya) (CEA-SORIN)
- Anticuerpo antigammaglobulina de cobaya (conejo) (CEA-SORIN)
- Anticuerpo anti-HGH humana (cobaya) (CEA-SORIN)

- Proteina portadora de Cortisol.

- Transcortina humana (CEA- SORIN)

- Re a c tivos.

- Todos fueron MERCK para análisis, excepto:
 - . Albúmina bovina, fracción V (SIGMA)
 - . Albúmina humana, fraccion V (SIGMA)

.N- Ethyl Maleimide (N.E.M.) (SIGMA)

1. Enzima.- Proteasa, obtenido directamente del músculo es-
queletico de rata por nosotros .

(1) Facilitada por la Doctora Esperanza Lazaro.

M E T O D O

I) Humanos.

Técnica experimental.

- a) Sobrecarga oral de glucosa.- Después de una noche de ayuno, y tras media hora de reposo, los pacientes ingirieron 50 gr. de glucosa, tras serle extraída una toma de sangre (valor basal) repitiendo esta a los 30', 60', 90' y 120' de la muestra basal.
- b) Sobrecarga intravenosa de glucosa.- Al día siguiente, y -- tras las mismas precauciones iniciales, se extrajo una muestra sanguínea, introduciendo a continuación 1 ml/kg. de peso teórico de una solución glucosada al 50% (glucosmon R-- 50)m en los tres minutos siguientes (o sea, 0,5 gr. de glucosa por Kg de peso teórico).

Seguidamente, se tomaron nuevas muestras a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60, minutos. En cada toma se determinó -- glucosa en sangre total, guardándose el plasma correspondiente a la sangre restante, dividido en pequeñas fracciones a -20º C. para la determinación posterior de insulina, Proinsulina, Hormona de Crecimiento, Cortisol y aminoácidos.

La extracción de sangre para valoración de los cinco últimos parámetros señalados, fue realizada con jeringa heparinizada.

II) Animales.

Las ratas fueron guillotizadas. Inmediatamente fueron disecadas ambas patas posteriores, y los distintos trozos de músculo fueron introducidos en nitrógeno líquido, para su inmediata congelación. Posteriormente y en dicho estado, -- fueron pesados, estableciéndose un "pool" con el tejido muscular procedentes de los distintos animales.

III) Cálculos

- a) Sobrecarga oral de glucosa.- Para obtener la secreción relativa de insulina, que correspondía al estímulo glucémico en los distintos puntos de la curva se calcularon los incrementos que sufrían desde las cifras basales hasta las obtenidas en las distintas muestras, estableciendo un cociente $\frac{\Delta \text{insulina}}{\Delta \text{glucemia}}$ ----- según SELTZER y colb.(11)
- b) Sobrecarga intravenosa de glucosa.-Una vez obtenidas las cifras de glucemia correspondientes a cada extracción la tasa de desaparición de glucosa de la circulación (constante de aclaramiento) fue calculada por el método de mínimos cuadrados a partir de la transformación logarítmica de los valores de glucemia.

$$B_{st} = B_{so} \cdot e^{-kt}$$

B_{so} = Glucosa sanguínea en tiempo cero

B_{st} = Glucosa sanguínea en cualquier momento (60) minutos)

k. Tasa de desaparición de glucosa en tiempo t.

Todos los valores de glucemia desde los 10 a los 60 minutos ambos inclusive, fueron usados en el cálculo de Kg., - con las excepciones presentadas por O'SULLIVAN (60).

- c) Se elaboraron los resultados estadísticamente, con ayuda una "Olivetti-Programa 101" y la significancia de las medidas fue determinada por el "test" t de Student (67).

IV) DETERMINACIONES DE LABORATORIO.

Todas ellas fueron realizadas por duplicado.

- 1) - Glucemia.- Técnica de Glucosa Oxidasa HUGGET (67),
- 2) - Aminoácidos.- Su separación fue desarrollada sobre placas de celulosa (Merck)

Análisis Radioinmunológico.

Dicho método fue desarrollado por BERSON y YALOW (68) sobre la reacción altamente específica entre una hormona protéica y su anticuerpo:

Si ponemos una cantidad constante de hormona marcada con un isótopo radiactivo, y suficiente cantidad de anticuerpo antihormona, se formará un complejo antígeno anticuerpo, en el que toda la hormona marcada quedará unida. Si ante ese mismo sistema, introducimos hormona no marcada del mismo tipo que ésta, dicha hormona competirá con la primera por unirse al anticuerpo, quedando mas o menos hormona marcada unida en función de la cantidad de hormona no marcada introducida en el sistema.

Posteriormente, las fracciones de hormona libre y unida al anticuerpo se separan, y se mide la radiactividad en cada una de las porciones.

Para determinar la concentración de hormona en una muestra desconocida, la inhibición de la unión por la muestra es comparada a una curva "standard", derivada de la inhibición que se produce en la hormona marcada por pequeñas cantidades conocidas de hormona "standard".

Dicho principio, es general para todos los análisis radioinmunológicos, pero dentro de él, han surgido multitud de variantes que residen fundamentalmente; en los tiempos de incubación para lograr la reacción, en el orden de adición de los distintos componentes del sistema, en los distintos métodos para separar las fracciones de hormona ligada, libre, etc.

No obstante, como el análisis incluso somero de los diversos variantes, nos forzaría a la exposición de una gran cantidad de detalles, pasaremos a describir los métodos que hemos utilizado en las determinaciones de Insulina y Hormona de crecimiento.

3) Análisis radioinmunológico de INSULINA.

El método seguido fue el descrito por HALES y RANDLE (69), o , de doble anticuerpo, en el que la separación - de las fracciones libre y ligada, se desarrolla la precipitación del complejo hormona-anticuerpo por un segundo anticuerpo que reacciona sobre el primero, aumentando de esta forma el peso molecular del complejo y haciendo que este precipite.

Reactivos utilizados:

- Insulina de cerdo marcada con Iodo I^{125} , 100 μ Ci/ .
- Insulina humana que se utiliza como "standard"
- Buffer fosfato:
 - (A)- 0,04 M, pH 7,4 y albúmina bovina 0,5%
 - (B)- 0,04 M, pH 7,4 y albúmina bovina 0,4%.
- Anticuerpos antiinsulina de cerdo. (Estos anticuerpos fueron preparados en cobayas).
- Anticuerpos antigammaglobulina de cobayas. (Obtenidos en conejos).

(Ambos anticuerpos nos fueron suministrados unidos, en estado liofilizada, con capacidad para unir de un 40 á 50% de la dosis "standard" de insulina marcada).

- Los buffers fueron preparados con agua bidestilada.
- Todo el material de vidrio utilizado era siliconado -- previamente, para evitar la unión de la hormona al vidrio.

Preparación de la curva "standard"

La solución de insulina humana "standard" se diluye con tampon fosfato para obtener las concentraciones apropiadas en un intervalo de 10 á 100 μ U/ ml. según el esquema siguiente:

STANDARD A ₅ : 1 ml de solución "Standard madre"	200 μ U/ml
STANDARD A ₄ : 1 ml de Standard A ₅	100 μ U/ml
†	
1 ml de Tampon	
STANDARD A ₃ : 1 ml de Standard A ₄	50 μ U/ml
†	
1 ml de Tampon	
STANDARD A ₂ : 1 ml de Standard A ₃	25 μ U/ml
†	
1 ml de Tampon	
STANDARD A : 1 ml de Standard A ₂	10 μ U/ml
†	
1 ml de Tampon.	

Dosificación.

Son necesarios para su realizacion numerosos tubos.

Los tubos 1 a 16 son utilizados para la construcción de la curva "standard", los otros son utilizados para las muestras a dosificar, siendo aconsejable realizar las determinadas por duplicado.

1º) Pipetear en los tubos:

- 1 - 2 ... 0,2 ml. de tampon. Actividad total
- 3 - 4 ... 0,2 ml. de tampon. Control
- 5 - 5 ... 0,1 ml de tampon. Punto "cero" de la curva de lectura.

El contaje de los tubos 3 y 4 permite determinar el porcentaje de insulina marcada absorbida en la memb rana filtrante.

29) Pipetear en los tubos:

7 - 80,1 ml de "standard" A₁

9 -100,1 ml de "standard" A₂

11- 120,1 ml. de "standard" A₃

13- 140,1 ml de "standard" A₄

15- 160.1 ml de "standard" A₅

39) Pipetear en los tubos en adelante, según el número de muestras a dosificar, 0,1 ml de cada una de ellas.

49) Pipetear en los tubos 5 en adelante, 0,1 ml de reactivo precipitante. (anticuerpo suficiente para precipitar 50% de las dosis individual por tubo de Insulina I¹²⁵).

59) Mezclar el contenido de cada tubo (en VORTEX) y mantener los a continuación entre 2 - 49 C. encámara fría durante seis horas.

69) Pipetear en todos los tubos 0,1 ml de solución de Insulina marcada (200 picogramos por tubo), y tras volver agi--tar continuar la incubación durante las diez y ocho horas siguientes.

79) Separación de Fracciones por filtración:

Se basa en la imposibilidad que presenta el complejo Hormona-Anticuerpo para pasar a través de una membrana de poro pequeño, (OXOID) debido a su gran peso molecular, mientras que la hormona no ligada pasa perfectamente. El contaje de radioactividad de la fracción ligada, así aislada, estará en razón inversa de la cantidad de hormona a dosificar.

Al menos seis horas antes de la filtración se deben dejar sumergidas las membranas OXOID en el tampon B, y mantenerlos en él hasta su utilización.

Cuando se va a comenzar la filtración, se sacan los tubos de la cámara fría, se agitan en VORTEX, y se depositan en el hielo picado, hasta que la llegue el momento de cada uno de ellos de ser filtrados.

El filtro Millipore utilizado, se deposita sobre un Kitasato al cual se hace vacío con trompa de agua.

Se aplica una membrana sobre el filtro, se toma el primero de los tubos y con pipeta Pasteur se aspira el contenido, que a continuación se deposita sobre el filtro. Se limpia el tubo dos veces con 0,5 ml de tampon fosfato B depositando también dichas fracciones sobre el filtro. A continuación, se toma el disco y se introduce en los tubos de contaje de radiactividad.

Todas estas maniobras se realizan con cada uno de los tubos preparados para ser analizados.

Calculo de resultados.

Una vez obtenidos las cuentas por minuto, de cada uno de los tubos (CPM), se obtienen los valores medios correspondientes a cada determinación.

El contaje de los tubos 3 - 4 es el blanco que debe ser sustraído al contaje de cada uno de los tubos para obtener la medida corregida.

Las C.P.M. correspondientes a los tubos 5 y 6 representa el valor "cero".

La construcción de la curva "standard" se hace llegando a un sistema de coordenadas (sobre papel milimetrado) en abscisa las concentraciones de Hormona "standard" y en ordenada los contajes obtenidos en cada uno de los puntos, siendo el valor "cero" las C.P.M. obtenidas en los tubos 5 y 6.

De esta forma, se obtiene una curva de tipo hipérbola-equilátera asintótica que permitirá medir la concentración de hormona en las muestras a medir, al llevar a ella las C. M. obtenidas.

El mismo tipo de curvas es obtenido cuando tomando el valor "cero" como 100% se expresan los valores "standard" - como porcentaje de dicho "cero".

b) ANALISIS RADIOIMMUNOLOGICO DE HORMONADE CRECIMIENTO.

Como el proceder que hemos seguido para la cuantificación de dicha hormona, basadas en las técnicas de MOLINATTI y cols.(70), presenta una serie de puntos en común con el utilizado en la determinación de Insulina, solo señalaremos aquellos en los que difiere.

La determinación HGH en comparación con la de la insulina, presenta algunos nuevos problemas:

- a) La cuantía de la degradación de la HGH marcada, es mayor.
- b) La preincubación de el anticuerpo anti-HGH y el anticuerpo precipitante, no puede ser desarrollado simultáneamente, como en el caso de la insulina; ya que ello produce una disminución del título de anticuerpo.
- c) La reacción de HGH-Anticuerpo, si se desarrolla a 49 C requiere de 100 a 120 horas para alcanzar el equilibrio.
- d) Las proteínas séricas interfieren durante la incubación, y si bien esto no es peculiar de la HGH, en el análisis de ella, puede tener suficiente importancia, ya que debido a la variabilidad de los niveles los plasmas deben diluirse en diferentes grados.:
- e) No existe actualmente un "standard" internacional de HGH.

Al no ser posible obviar la dificultad : a), es necesario utilizar pues, HGH¹²⁵ de reciente preparación:

La imposibilidad de realizar conjuntamente la incubación de ambos anticuerpos con la hormona obliga a desarrollar las independientemente, lo que incrementa la duración del análisis. Recientemente se ha visto (MOLINATTI y cols) que la reacción puede ocurrir a 37° C. sin alteración de ninguno de los reactivos, permitiendo ello que el tiempo de incubación sea

reducido significativamente (veinte y seis horas, en lugar de cien o ciento veinte horas a 42 C.).

En el análisis radioinmunológico es recomendada la disolución de las muestras plasmáticas que han de ser determinadas, ya que el contenido oscila, y a veces alcanza valores mucho más altos que aquellos puntos que disponemos en la curva "standard".

Con objeto de conseguir condiciones uniformes de concentración proteica, se utiliza la adición de una solución de albumina sérica humana al 5%.

La falta de un "standard" internacional, obliga en la práctica a cada investigador, a expresar sus resultados con referencia a su propio "standard" preparado, pesando la cantidad apropiada de un lote purificado de HGH, siendo éste generalmente solicitado al Dr. W. HELMI, (Bethesda U.S.A.). Los mismos procedimientos de purificación de la hormona, han sido -- utilizado por el Laboratorio de Fisiología Clínica de Pisa, el cual nos suministra la hormona "standard".

Reactivos utilizados.

- Hormona de crecimiento humana marcada con I^{125} .
- Hormona de crecimiento humana "standard"
- Primer anticuerpo: Anti-HGH. (Es obtenido en cobayas)
- Segundo anticuerpo: Anti-gammaglobulina de cobayas. (Es obtenido en conejos).
- Buffer borato 0,1 M pH 8,4.

Se emplea para la dilución del anticuerpo y la HGH marcada.

- Buffer fosfato 0,04 M pH 7,4 con 4% albúmina bovina.

Se emplea para el lavado de los tubos y membranas después de la filtración.

- Solución de albúmina sérica humana: para conseguir una concentración de proteínas homogéneas en todas las pruebas. Se prepara disolviendo 5 gr. de Albúmina humana en 100 ml. de buffer Borato.

Dosificación.

- 1º) Establecer los tubos, en los mismos grupos que en la técnica superior:
- 2º) Pipetear 0,1 ml de Buffer Borato en los tubos "cero".
- 3º) Pipetar 0,1 ml de Albúmina Humana 5% en todos los tubos.
- 4º) Pipetear 0,1 ml de "standard" de diferentes concentraciones en los tubos correspondientes.
- 5º) 0,1 ml de las plasmas que van a ser medidos. Las disoluciones de los plasmas se desarrollan en Buffer Borato.
- 6º) Depositar el primer anticuerpo en todos los tubos, menos en los "ceros" y los de actividad total, en cantidad suficiente para que ligue al menos el 50% de la actividad total, y en volúmenes de 0,1 ml.
- 7º) Mezclar cuidadosamente el contenido de cada tubo (VORTEX) y luego depositar los tubos en un baño termostático a 37º C. durante seis horas.
- 8º) Al cabo de dicho tiempo mezclar el contenido de cada tubo y añadir 0,1 ml de HGH marcada en todos los tubos, mezclar y llevar de nuevo los tubos al baño termostático a 37º C. durante veinte o veinticuatro horas.
- 9º) Tras dicha incubación depositar 0,1 ml del segundo anticuerpo en todos los tubos, menos en aquellos tomados como control y "ceros" y mezclar de nuevo. Incubar de nuevo en cámara fría de 2 a 4º C. durante diez y ocho a veinticuatro horas.
- 10º) Al final de dicho periodo de proceda filtrar y al cálculo de resultados como en la técnica anteriormente expuesta.

DETERMINACION DE CORTISOL POR DESPLAZAMIENTO PROTEICO.

La base fundamental de este tipo de determinaciones es muy similar al análisis radioinmunológico, y se basa en la fijación competitiva del esteroide marcado isotópicamente, y el no marcado, sobre una proteína específica (Transcortina) MURPHY (71).

Se efectúa la dosificación midiendo las cantidades de Cortisol tritiado ligado a transcortina después de haber competido con cantidades conocidas de Cortisol no marcado, y tras la separación de las fracciones libres y ligadas.

Las etapas esenciales en una dosificación son las siguientes:

- 1º) Disociación entre cortisol plasmático a dosificar y proteína, con posterior extracción del Cortisol.
- 2) Competición del cortisol no marcado (endógeno o "standard") con el complejo: Transcortina-Cortisol tritiado.
- 3º) Separación de las fracciones libre y ligada, por fijación de la primera sobre un adsorbente insoluble.
- 4º) Contaje de la radiactividad ligada a la transcortina.

Reactivos utilizados.

+Buffer Fosfato: Se lleva 1,4 gramos de $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1000 ml de agua bidestilada y se ajusta a pH 7,4 con hidróxido sódico 2 N.

- Diclorometano

- Transcortina-Cortisol tritiado, ésta sustancia nos es suministrada liofilizada.

- Adsorbente insoluble: Carbón activo-Dextrano en proporción 10 / 1, en estado seco, dichos componentes se disuelven en tampón fosfato.

Antes de utilizarlo se debe homogeneizar en baño helado con un agitador magnético durante veinte o treinta minutos.

-Solución "standard" de cortisol.

Solución madre: 1 $\mu\text{g/ml}$ de etanol

- 1 ml de dicha solución + 9 ml de etanol = 100 mg/ml. Solución A
- 2,5 ml. de Solución A + 7,5 ml de etanol = 25 ng/ml - Solución B

- 0,40 ml. Solución A 40 ng /ml
- 0,30 ml Solución A 30 ng /ml.
- 0,20 ml Solucion A 20 ng /ml.
- 0,40 ml Solución B 10 ng / ml.
- 0,30 ml Solución B 7,5 ng/ ml.
- 0,20 ml Solucion B 5 ng/ ml.
- 0,10 ml Solución B 2,5 ng/ ml

-Solución de centelleo:

- 100 gramos de Naftaleno + 7 gr. de P.P.O. + 0,3 gr. Dimen-
til P.O.P. en 1.000 c.c. de DIOXANO.

Dosificación.

- 1º) Se añade 2 ml. de diclorometano, a los tubos que contiene 100µl de las muestras plasmáticas a dosificar. Agitarlas durante 10 minutos en agitador automático (70 r.p.m.).
- 2º) Se centrifuga durante 10 minutos a 3000 r.p.m.
- 3º) Se transfiere 1 ml de las fases de diclorometano a un grupo de tubos de ensayo, paralelos al anterior. En otro grupo, se deposita 0,1 ml de los "standard" ya previamente establecidos de Cortisol.

Se evapora el solvente orgánico de los tubos de cada grupo a 30 o 35º C utilizando corriente de nitrógeno.
- 4º) Se adiciona en todos los tubos 1 ml de solución de transcortina cortisol tritiado, y 1 ml también en dos tubos - que constituirán los tubos "ceros". Se mezcla a continuación el contenido de cada tubo con un mezclador VORTEX, y se ponen los tubos en un baño termostato a 40 o 45º C. durante cinco minutos.
- 5º) Depositar a continuación los tubos en un refrigerador a - 4º C. durante media hora.

- 62) Pipetear 0,50 ml de la solución de carbón-destrano en cada tubo, no debe transcurrir mas de 2 ó 3 minutos e entre el primer tubo y el último. Durante toda la operación los tubos deben estar sumergidos en hielo.
- 72) Mezclar el contenido de los tubos, e introducir los tubo a cámara fría durante quince minutos.
- 82) Centrifugar los tubos a 3.000 - 3500 r.p.m. durante - cinco minutos y transferir alucotas de 0,05 ml del - sobrenadante, en los viales de contaje para centello - líquido.
- 92) Añadir a cada vial de contaje, 10 ml de la solución de centelleo.
- 102) Contar las cuentas por minuto (C M) en contador de - centelleo líquido.

Con los contajes obtenidos en los "standard" se construye la curva, de forma similar a las técnicas expuestas anteriormente. Como los valores de los plamas corresponden a 0,05 ml de plasma, las contentraciones en ng/ml se determinan multiplicando los resultados por factor 20.

DETERMINACION RADIOIMMUNOLOGICA DE PROINSULINA.

Como la capacidad de unión de los anticuerpos antiinsulina es mucho mayor para la insulina que para la proinsulina, al utilizar éstos en nuestras determinaciones, necesitamos eliminar la primera del plasma como paso previo para cuantificar la segunda.

Como exponíamos en la sección "INTRODUCCION" del presente trabajo, hemos elegido para la realización de este importante paso la utilización de proteasa de musculo esquelético rata que previamente teníamos que obtener de dichos animales.

Por ello expondremos en primer lugar, el procedimiento de obtención y purificación de la mencionada proteasa, y a continuación las variantes que hemos introducido en el análisis radioinmunológico de insulina que nos ha servido de base.

Obtención y purificación del enzima.

- 1º) Una vez pesados los musculos y descongelados (Ver en METODO: animales) , éstos fueron limpiados de grasa y tejido conectivo y mezclados.
- 2º) Se homogeneizaron a continuación en un homogeneizador de alta velocidad (ULTRA-TURRAX). Todo ello en cámara fría y durante cinco intervalos de quince segundos, utilizando como medio, sacarosa 0,35 M. (5 ml /gr. de tejido).
- 3º) El homogenado fue centrifugado a 10.000xg durante una hora.
- 4º) Posteriormente el sobrenadante fue dializado tres veces durante al menos cuatro horas cada vez contra veinte volúmenes de agua destilada y desionizada.
- 5º) Todo el líquido resultante de la dialisis fue liofilizado.

- 69) El polvo seco resultante fue disuelto en 1/8 del volumen del sobrenadante de la ultracentrifugación 100.000xg y - el material que no se disolvió fue separado por cantrifu gación a 10.000xg durante diez minutos.
- 79) El contenido proteico fue entonces determinado por el mé todo de absorción A_{280}/A_{260} .
- 89) Se añadió suficiente buffer de acetato 0,015 M pH 5 para llevar la concentración proteica finala a 10 mg/ml. El - volumen de esta solución es de aqui en adelante referido como "V".
- 99) Se añadió el gel $Ca_3 (PO_4)_2$ necesario para obtener una - relación gel: proteina de 0,28:1. El gel fue preparado se gún el método de KELLIN y HARTREE (72).
- 109) La mezcla gel-proteina fue agitada en cámara fria a 49C. durante veinte minutos y a continuación, se centrifuga a 10.000xg durante diez minutos.
- 119) El sobrenadante fue eliminado y el gel resuspendido y -- agitado durante veinte minutos en "V" ml de buffer fosfa to 0,05 M pH 6,2.
- 129) Tras la sedimentación del gel por centrifugación y des-- cartar el sobrenadante, fue de nuevo agitado durante otros veinte minutos en "V" ml de buffer de fosfato 0,05 m pH 7,5.
- 139) Tras centrifugación el sobrenadante conteniendo la enzi- ma fue rapidamente dividido en pequeñas alicuotas de 2 ml y congelado a - 409 C.

Cada lote de proteasa de esta forma obtenida y purificada, fue sometida a pruebas para conocer su actividad y cuyos resultados se incluiran en el capitulo correspon--- diente. (RESULTADOS)

Análisis radioinmunológico.

Utilizamos como para insulina, el método de doble anticuerpo.

Reactivos utilizados.

- Anticuerpo anti-insulina de cerdo obtenida en cobayas.
- Anticuerpo anti-gammaglobulina de cobaya obtenido en conejos.
- Insulina de cerdo marcada con I¹²⁵
- Solución de N- Ethylmaleimide 0,01 M.
- Proteasa.
- "Standard" de proinsulina de cerdo. La solución A que nos fue enviada contenía una concentración de 1 mg/ml. A partir de ella conseguimos Soluciones B con concentración de 40 ng/ml, de éstas soluciones se preparan los trabajos, Soluciones C.

0,2 ml Solución B + 0,8 ml de Buffer fosfato = 8 ng/ml
0,1 ml Solución b + 0,9 ml de Buffer fosfato = 4 ng/ml
0,1 ml Solución B + 1,9 ml de Buffer fosfato = 2 ng/ml
0,1 ml Solución B + 4,9 ml de Buffer fosfato = 0,8ng/ml
0,1 ml Solución B + 9,9 ml de Buffer fosfato = 0,4ng/ml

Incubación Plasma + Protasa.

En aquellas muestras plasmáticas en que se determinó proinsulina, se usó el siguiente proceder. Se depositó en cada tubo (realizándose las determinaciones por duplicado), 100 μ l de plasma + 100 μ l de buffer fosfato + 50 μ l de proteasa (20 g. de proteína).

Dicha mezcla se incubó en agitador metabólico a 70 r. p.m. y 37°C durante 30 minutos y al final de la incubación, la reacción fue detenida por la adición de 50 μ l de N-Ethylmaleimide (N.E.M.).

Las curvas Standard recibieron 200 μ l de buffer fosfato en lugar de 100 μ l como en las determinaciones de insulina para que todos los tubos presentaran el mismo volumen, -asimismo fueron tambien incubados aunque sin añadirles proteasa.

A partir de este punto y una vez terminada la incubación, el proceder radioinmunologico, fue el mismo que el detallado anteriormente para la insulina, aunque, claro, es, - las actividades de las distintas muestras plasmaticas se leyeron en la curva de actividades de "standard" de proinsulina.

C A P I T U L O I I I

Lectura e interpretación comparativa de los
resultados obtenidos.

R E S U L T A D O S

Dividiremos el presente capítulo en dos apartados:

1º) - Pruebas de garantía de los métodos analíticos empleados.

2º) - Resultados al tema estudiado.

1º) Pruebas de garantía de los métodos analíticos empleados.

- Determinación de Insulina inmunorreactiva.

a) Prueba SENSIBILIDAD

- 10 μ U/ ml (Límite inferior de sensibilidad)

b) Prueba REPRODUCTIBILIDAD.

- Plasma utilizado: 25 μ U.

Se realizaron ocho determinaciones del mismo plasma:

Media... 25,5 μ U

D.S. ... \pm 1

c) Prueba RECUPERACION.

- Plasma utilizado: A = 14,50 μ U/ml

A \pm 10 μ U 24,5 μ U ---- 100 %

A \pm 20 μ U 34,5 μ U ---- 100 %

A \pm 50 μ U 63 μ U ---- 97 %

A \pm 100 μ U 100 μ U ---- 96 %

- Determinación de hormona de crecimiento humana.

a) Prueba SENSIBILIDAD

0,5 ng /ml (Límite inferior de sensibilidad)

b) Prueba REPRODUCTIBILIDAD

- Plasma utilizado: 5 ng/ml

- Se realizaron ocho determinaciones del mismo

plasma:

- Media ... 5,6 ng/ml

- D.S. ... \pm 0,8

c) Prueba RECUPERACION

- Plasma utilizado: A = 0,7 ng/ml

A ± 1 ng 1,7 ng --- 100%

A ± 2,5 ng..... 3,4 ng --- 106%

A ± 5 ng..... 6,1 ng --- 105%

A ± 10 ng.....11,4 ng --- 106%

- Determinación cortisol plasmático.

a) Prueba SENSIBILIDAD

-0,5 µg/100 ml (límite inferior de sensibilidad)

b) Prueba REPRODUCTIBILIDAD

-Plasma utilizado: 5µg/ 100 ml.

Se realizaron ocho determinaciones del mismo

plasma:

Media 5,8 µg/ 100 ml

D.S. ± 0,50

c) Prueba RECUPERACION

- Plasma utilizado: A = 8,2 µg/100 ml.

A ± 1 ng 8,4 µg --- 102 %

A ± 3 g11,6 µg --- 103 %

A ± 5 g14,1 µg --- 106 %

A ± 10 g19,2 µg --- 105 %

DETERMINACION DE PROINSULINA PLASMATICA.

Antes de utilizar el procedimiento descrito para valoración de preinsulina debíamos establecer.

- A)- Que el paso de preincubación introducido, no alteraba "per se" el desarrollo del análisis inmunológico.
- B)- Que la actividad de la proteasa obtenida era lo suficientemente intensa como para destruir la insulina circulante, pero sin alterar de forma significativa la proinsulina existente.
- C)- Establecer los parámetros de garantía con dicho sistema: sensibilidad, reproductibilidad y recuperación.
- D- Estudio comparativo de la actividad del anticuerpo antiinsulina utilizado por nosotros sobre "standard" de Insulina y Proinsulina.

A)- La figura 1 muestra el desarrollo idéntico de tres curvas de insulina humana "standard". Una de ellas (control) fue obtenida en las condiciones de proceder normal ya antes mencionados. La segunda igualmente que la anterior pero adicionándole 100 μ l mas de Buffer, volumen correspondiente a 50 μ l de proteasa mas 50 μ l de NEM. En la tercera curva, a los "standard" de insulina con volumen de Buffer normal, se les sometió a 30' de incubación a 37°C., y posteriormente se les añadió 50 μ l de NEM.

B)- La figura 2 muestra la degradación que sufren muestras de insulina humana añadida a 100 μ l de Buffer, cuando son sometidas a incubación con 50 μ l de proteasa obtenida por nosotros.

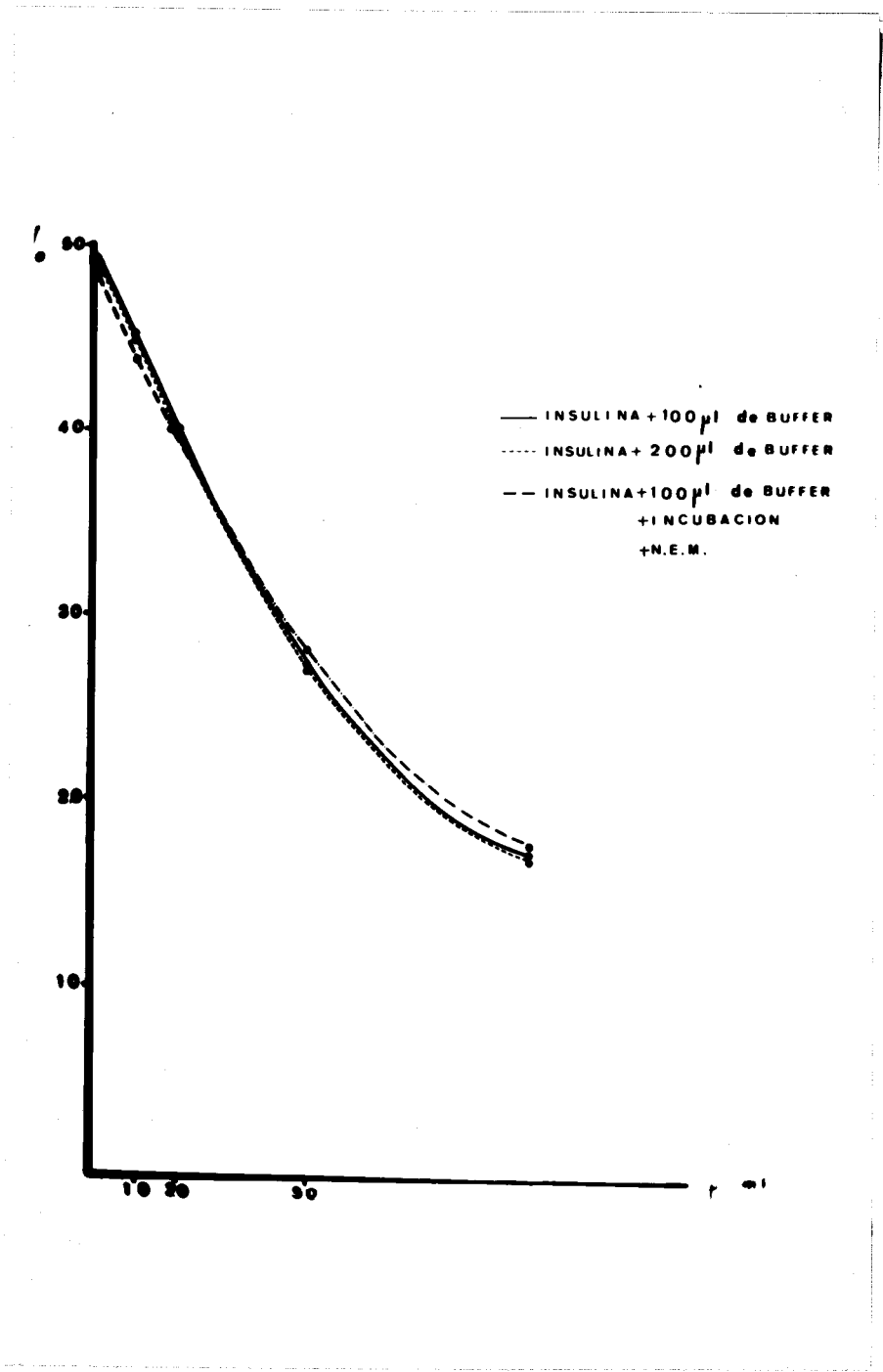


FIG. 1

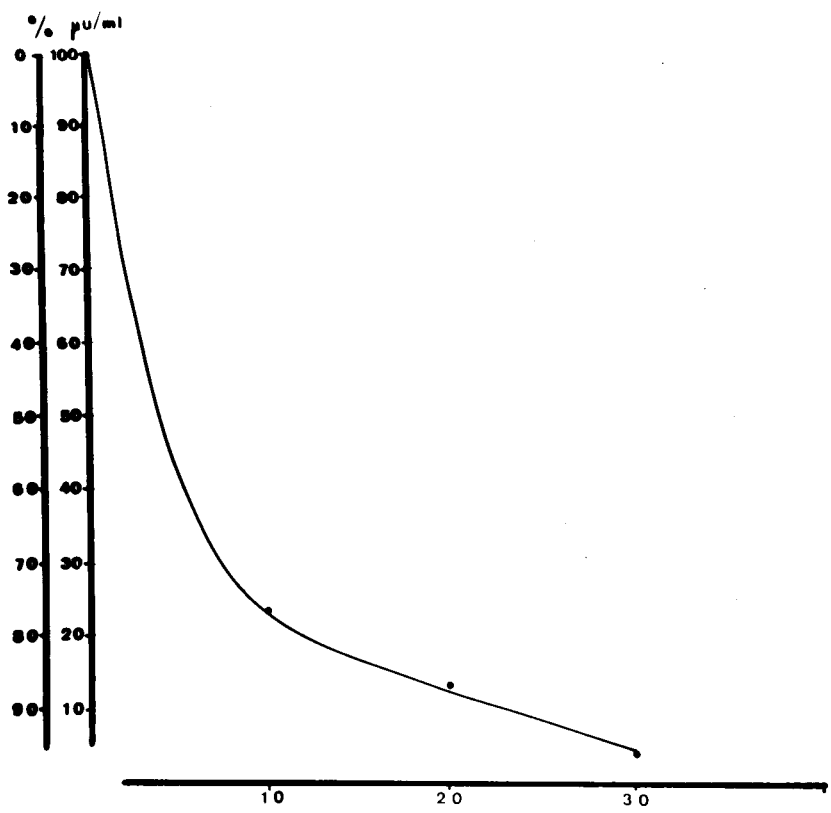


FIG. 2

Insulina añadida: 100 μ U.

Tiempo de incubación		Inactivación
0' 100 μ U	
10' 23 μ U	77 %
20' 13 μ U	87 %
30' 4 μ U	96 %

La figura 3 ofrece los valores de la misma prueba pero utilizando Proinsulina en lugar de Insulina.

Tipo de incubación		Inactivación
0' 4 ng	
10' 4 ng	0 %
20' 3,9 ng	2,5 %
30' 3,8 ng	5 %

C) - **Parámetros de garantía del método:**

- **Sensibilidad:** Límite inferior de sensibilidad: 0,4 ng/ml
- **Reproductibilidad:** El cuadro I muestra los resultados obtenidos en ocho valoraciones del mismo plasma.
- **Recuperación:** El cuadro II, ofrece los resultados obtenidos de Insulina inmunorreactiva, en una serie de muestras plasmáticas (mismo plasma) con cantidades crecientes de ambas hormonas.

El cuadro III, ofrece los resultados obtenidos de Proinsulina en una serie de muestras plasmáticas (mismo plasma) ante cantidades crecientes de Insulina y Proinsulina, e incubación -- con proteasa.

Para la valoración se utilizó "standard" de Proinsulina.

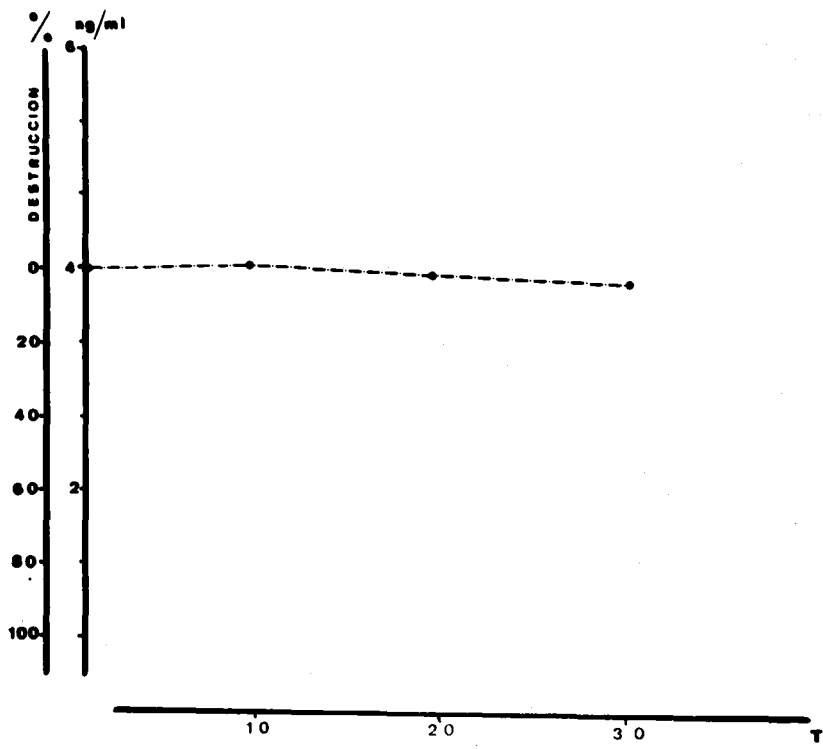


FIG. 3

MUESTRA	ng/ml
1	2,05
2	2,10
3	1,98
4	2,13
5	2,00
6	2,20
7	1,98
8	1,97

Media 2,05

D.S. $\pm 0,07$

CUADRO I

		INSULINA AÑADIDA ng ml		PROINSULINA AÑADIDA ng ml	I.R.I. ng ml
PLASMA					0,88
0,88	+	0,5	+	0,2	1,28
0,88	+	1	+	0,2	1,96
0,88	+	2	+	0,2	2,92
0,88	+	0,5	+	0,5	1,38
0,88	+	1	+	0,5	2,00
0,88	+	2	+	0,5	3,00
0,88	+	0,5	+	1	1,60
0,88	+	1	+	1	2,24
0,88	+	2	+	1	3,42

CUADRO II

		INSULINA AÑADIDA ng ml		PROINSULINA AÑADIDA ng ml	PROINSULINA DETERMINADA ng ml
PLASMA					1,20
1,20	+	0,5	+	0,2	1,56
1,20	+	1	+	0,2	1,55
1,20	+	2	+	0,2	1,80
1,20	+	0,5	+	0,5	1,72
1,20	+	1	+	0,5	1,72
1,20	+	2	+	0,5	1,80
1,20	+	0,5	+	1	1,68
1,20	+	1	+	1	1,96
1,20	+	2	+	1	1,88

CUADRO III

D) - La fig 4 muestra el desarrollo paralelo de las curvas correspondientes al análisis radioinmunológico de "standard" de insulina y proinsulina frente a los anticuerpos antiinsulina que utilizamos, En ella puede apreciarse la mayor reactividad del anticuerpo antiinsulina con los "standard" de in su li na.

Así pues, de la valoración de Proinsulina, utilizando nuestros anticuerpos antiinsulina y "standard" de in su li na resultarían valores dos o tres veces menores. Es por ello, que en nuestras determinaciones decidimos utilizar - "standard" de Proinsulina.

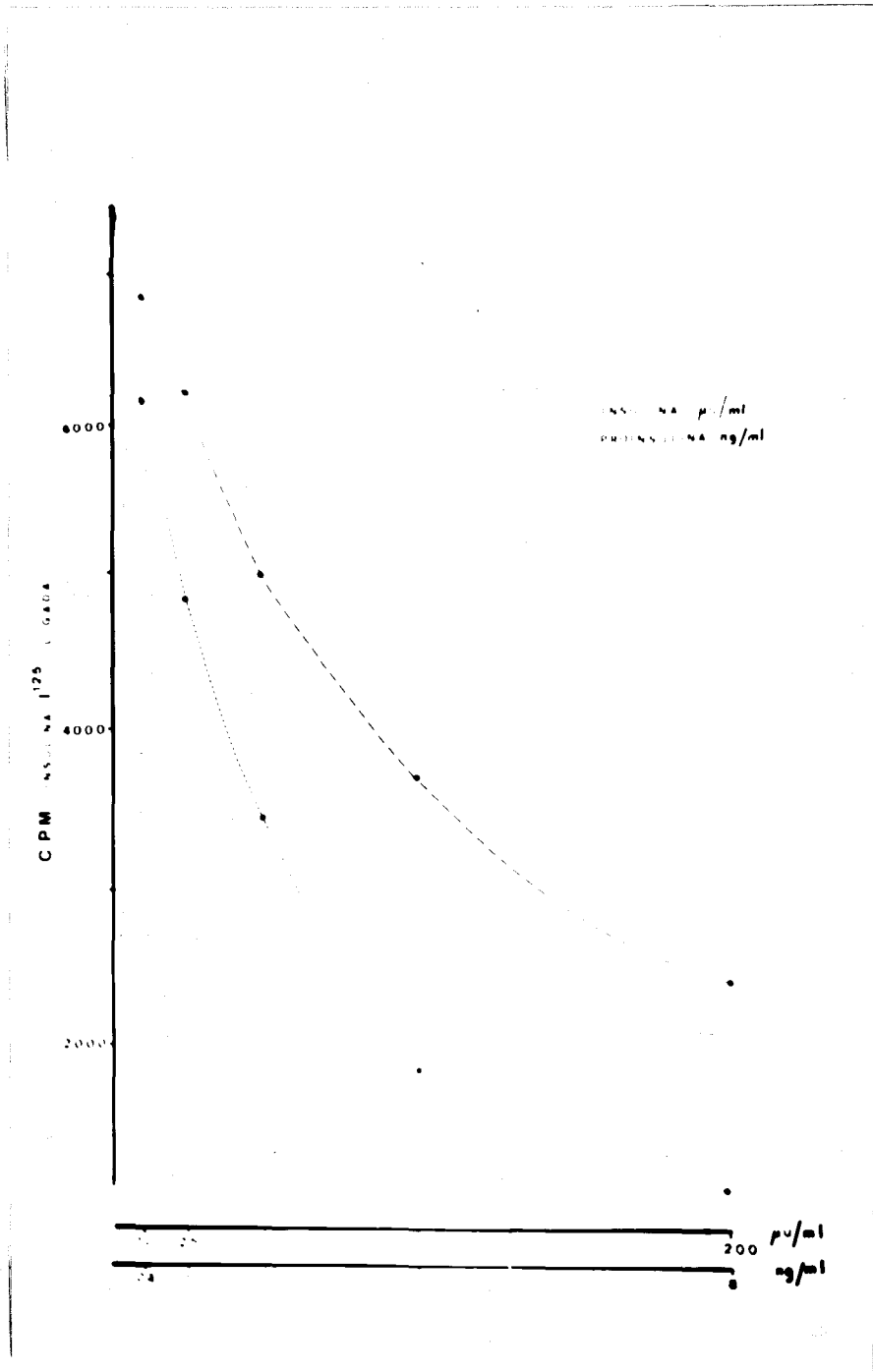


FIG. 4

2o) RESULTADOS AL TEMA ESTUDIADO

A)- Sobrecarga oral de glucosa.

I/ Glucemia.- En la figura nº 5 aparecen las curvas de glucemia medias representativas de cada uno de los grupos, y en los cuadros IV y V los valores medios con sus respectivas desviaciones "standards" y su significatividad estadística.

- a) Cirróticos normales.- Aunque el grupo de los sujetos cirróticos normales, presentó glucemias superiores al grupo de los normales, estas no fueron significativas estadísticamente hasta los 60', 90' y 120'.
- b) Cirróticos diabéticos y diabéticos de la madurez.- En cambio los dos grupos restantes cirróticos diabéticos y diabéticos, mostraban glucemias elevadas significativamente superiores en sus valores basales y a lo largo de toda la curva.
- c) Cirróticos normales y cirróticos diabéticos. Cuando se compararon los dos grupos de cirróticos entre sí (cuadro V) el comportamiento de los niveles de glucemia eran similares, aunque superiores en los cirróticos diabéticos; y este no difirió ostensiblemente hasta los 90 y 120 minutos, tiempo en que los valores de los cirróticos normales descendieron, mientras que los cirróticos diabéticos, se mantenían en cifras altas ($P < 0,02$ y $0,01$).
- d) Diabéticos y cirróticos diabéticos.- Por último, la comparación de los grupos diabéticos y cirróticos diabéticos no permitió establecer una diferencia significativa, aunque las cifras de glucemia eran ligeramente superiores en los primeros.

II/ Insulinemias.. La figura 6 muestra el desarrollo gráfico de las medias de insulinemias de los distintos grupos, y los cuadros VI y VII los valores medios desviaciones "standards" y

GLUCEMIAS

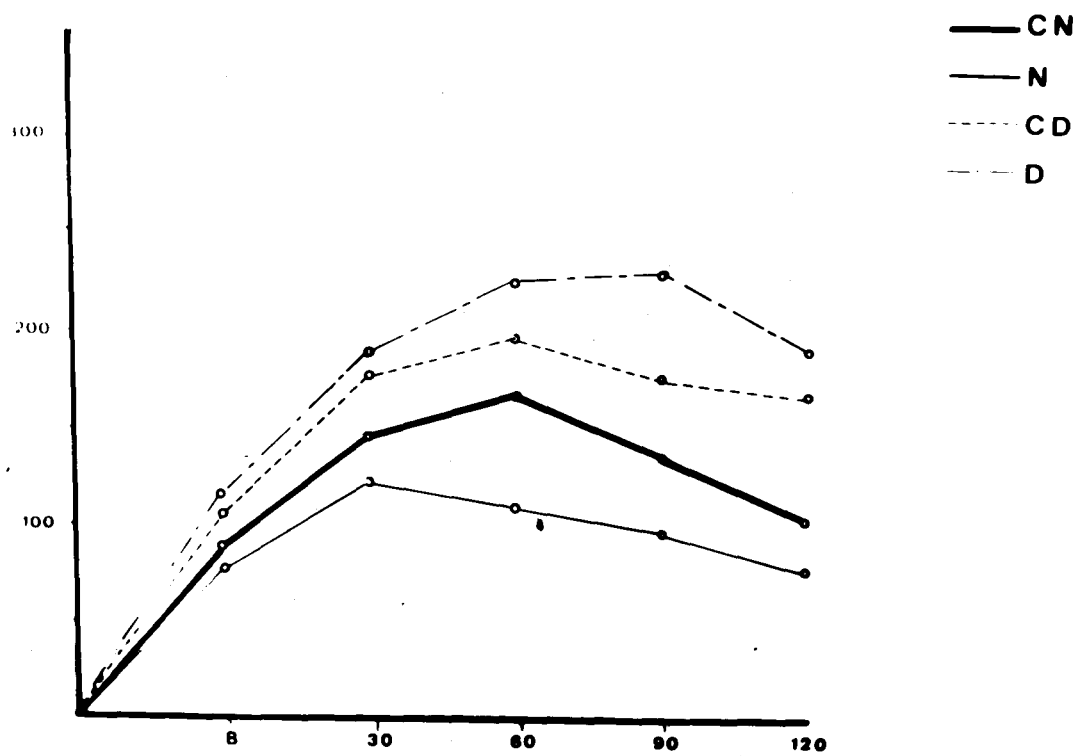


FIG. 5

G L U C E M I A S

		8	30	60	90	120
NORMALES	M	0,79	1,20	1,11	0,95	0,79
	DS	±0,09	±0,19	±0,23	±0,21	±0,12
CIRR. NORMALES	M	0,87	1,40	1,65	1,33	1,02
	DS	±0,17	±0,56	±0,51	±0,33	±0,20
	P <	NS	NS	0,05	0,05	0,02
CIRR. DIABETICOS	M	1,04	1,76	1,97	1,74	1,65
	DS	±0,24	±0,69	±0,41	±0,24	±0,36
	P <	0,01	0,02	0,001	0,001	0,001
DIABETICOS	M	1,11	1,88	2,25	2,28	1,91
	DS	±0,14	±0,33	±0,68	±1,00	±0,84
	P <	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

CUADRO IV

		8	30	60	90	120
CIRR. NORMALES	M	0,87	1,40	1,65	1,33	1,02
	DS	±0,17	±0,56	±0,51	±0,33	±0,20
CIRR. DIABETICOS	M	1,04	1,76	1,97	1,74	1,65
	DS	±0,24	±0,69	±0,41	±0,24	±0,36
	P <	NS	NS	NS	0,02	0,01
CIRR. DIABETICOS	M	1,04	1,76	1,97	1,74	1,65
	DS	±0,24	±0,69	±0,41	±0,24	±0,36
DIABETICOS	M	1,11	1,88	2,25	2,28	1,91
	DS	±0,14	±0,33	±0,68	±1,00	±0,84
	P <	NS	NS	NS	NS	NS

CUADRO V

INSULINEMIA

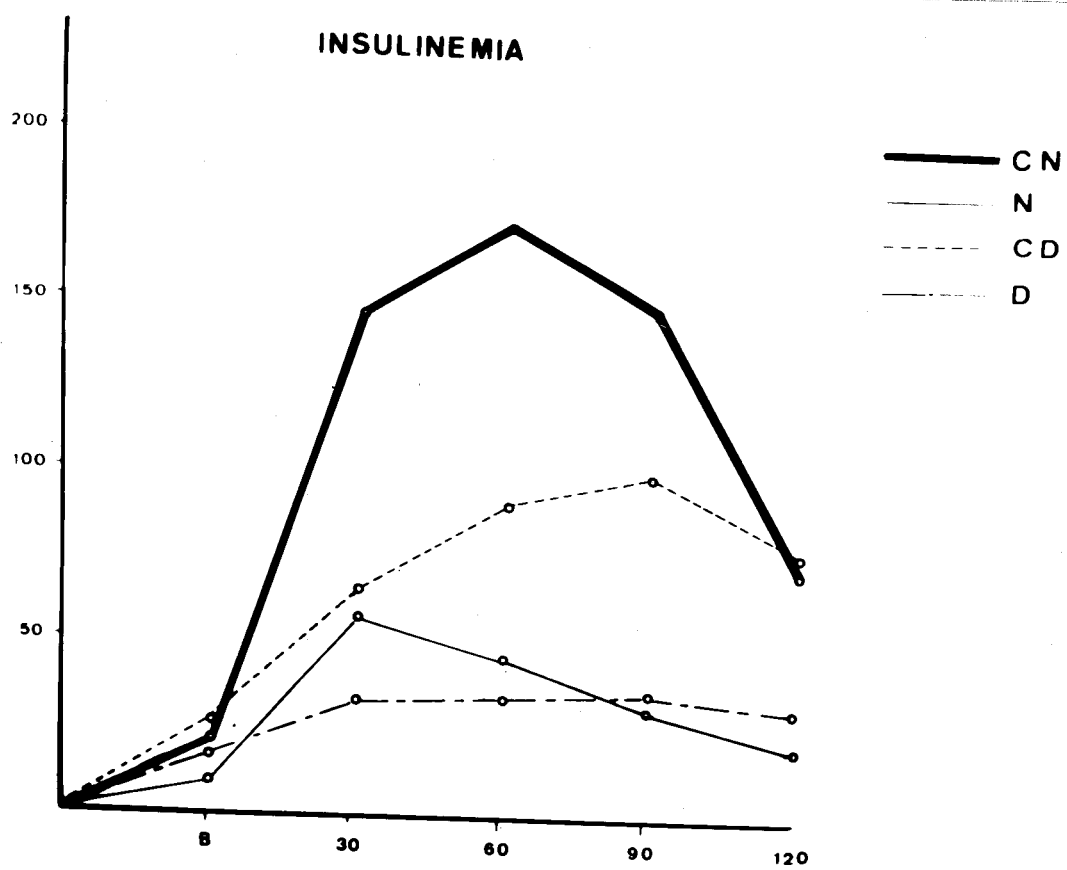


FIG. 6

I N S U L I N E M I A S

		B	30°	60°	90°	120°
NORMALES	M	9,26	57	43,80	23,07	20,23
	DS	±1,64	±19,5	±13,20	±16,40	±13,63
	P<					
CIRR. NORMALES	M	20,33	145,66	172,66	148,33	73
	DS	±6,02	±69,61	±53,16	±70,76	±35
	P<	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
CIRR. DIABETICOS	M	23,80	64,20	91,60	99,50	77,70
	DS	±13,95	±29,64	±41,47	±37,73	±56,36
	P<	0,01	NS	0,001	0,001	0,001
DIABETICOS	M	17,8	32,66	34,66	34	32,33
	DS	±12,65	±16,31	±13,41	±11,18	±10,07
	P<	0,02	0,02	NS	NS	NS

CUADRO VI

I N S U L I N E M I A S

		B	30°	60°	90°	120°
CIRR. NORMALES	M	20,33	145,66	172,66	148,33	73
	DS	±6,02	±69,61	±53,16	±70,76	±35
	P<					
CIRR. DIABETICOS	M	23,80	64,20	91,60	99,50	77,70
	DS	±13,95	±29,64	±41,47	±37,73	±56,36
	P<	NS	0,01	0,02	NS	NS
CIRR. DIABETICOS	M	23,80	64,20	91,60	99,50	77,70
	DS	±13,95	±29,64	±41,47	±37,73	±56,36
	P<					
DIABETICOS	M	17,8	32,66	34,66	34	32,33
	DS	12,65	16,31	13,41	11,18	10,07
	P<	NS	0,05	0,01	0,01	NS

CUADRO VII

significancia estadística de los mismos.

- a) Sujetos normales.- Los sujetos normales presentan su máximo valor a los 30', mientras que todos los demás grupos, - partiendo de cifras basales superiores lo alcanza los 60'.
- b) Cirróticos normales.- Los cirróticos normales, ofrecen cifras insulinémicas mucho más altas en todos sus puntos que los normales ($P < 0,001$).
- c) Cirróticos diabéticos.- Algo similar, sucede con los cirróticos diabéticos, aunque a los 30' (punto de mayor secreción en los sujetos normales), la diferencia no alcanza - significatividad estadística.
- d) Cirróticos normales y cirróticos diabéticos.- Si bien las cifras obtenidas en los cirróticos normales eran superiores a las de los cirróticos diabéticos, solo a los 30' y 60' fueron significativas ($P < 0,01, 0,02$).
- e) Diabéticos y cirróticos diabéticos.- Y casi idénticos resultados se obtuvieron al comparar cirróticos diabéticos y diabéticos, aunque aquí persistía la diferencia a los 90' - ($P < 0,05; 0,01; 0,01$).

III/ Cociente $\frac{\Delta \text{Insulina}}{\Delta \text{Glucemia}}$.- El cociente de dichos incrementos, nos permitió apreciar y comparar, la respuesta de los diferentes grupos ante la misma cuantía de estímulo. El análisis del gráfico 7, y los cuadros XIII y IX, nos ofrecen los siguientes resultados:

- a) Cirróticos normales.- Los cirróticos normales segregan mucha más cantidad de insulina que los sujetos normales, siendo ello muy evidente en los puntos B-60', B-90' ($P < 0,02$ y $0,05$).

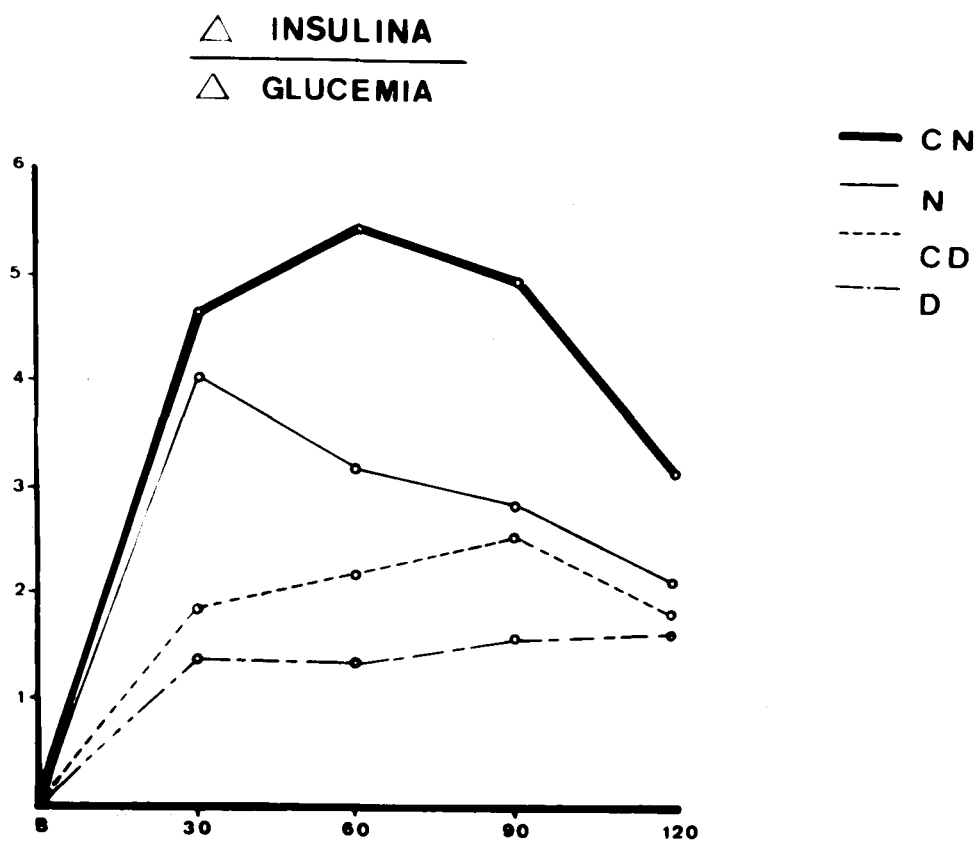






FIG. 7

 I N S U L I N A
 G L U C E M I A

		B-30	B-60	B-90	B-120
NORMALES	M	4,09	3,29	2,89	2,12
	DS	±1,19	±0,78	±1,22	±1,26
CIRR. NORMALES	M	4,66	5,48	5,06	3,20
	DS	±1,89	±2,82	±2,60	±1,78
	P<	NS	0,02	0,05	NS
CIRR. DIABETICOS	M	1,77	2,24	2,58	1,94
	DS	±0,62	±0,95	±1,12	±1,10
	P<	0,001	0,02	NS	NS
DIABETICOS	M	1,42	1,35	1,51	1,49
	DS	±1,05	±0,90	±1,11	±0,95
	P<	0,001	0,001	NS	NS

CUADRO VIII

 I N S U L I N A
 G L U C E M I A

		B-30	B-60	B-90	B-120
CIRR. NORMALES	M	4,66	5,48	5,06	3,20
	DS	±1,89	±2,82	±2,60	±1,78
CIRR. DIABETICOS	M	1,77	2,24	2,58	1,94
	DS	±0,62	±0,95	±1,12	±1,10
	P<	0,001	0,01	0,05	NS
CIRR. DIABETICOS	M	1,77	2,24	2,58	1,94
	DS	±0,62	±0,95	±1,12	±1,10
	P<	NS	NS	NS	NS
DIABETICOS	M	1,42	1,35	1,51	1,49
	DS	±1,05	±0,90	±1,11	±0,95
	P<	NS	NS	NS	NS

CUADRO IX

- b) Cirróticos diabéticos y diabéticos.- En cambio, en los grupos diabéticos y diabéticos, la secreción relativa al estímulo, es menor en los cuatro periodos observados, apareciendo el estudio altamente significativo estadísticamente en los puntos B-30 , B-60.
- c) Cirróticos normales y cirróticos diabéticos.- La comparación entre ambos grupos de cirróticos, ofrece clara evidencia del diferente comportamiento de ellos, con valores muy altos en los cirróticos normales (B-30: $P < 0,001$; B-60: $P < 0,01$; B-90: $P < 0,05$).
- d) Diabéticos y cirróticos diabéticos.- Por el contrario, los Cirróticos diabéticos y los diabéticos presentan un comportamiento idéntico en todos los puntos, ya que si bien existen valores medios algo superiores en los primeros, dichas diferencias no son estadísticamente significativas.

IV PROINSULINA PLASMÁTICA.

- Normales -

De los 13 sujetos iniciales se tomaron seis, como controles.

En la figura 8 aparece el comportamiento medio de Insulina y Proinsulina plasmática a lo largo de la prueba de sobrecarga.

El límite de sensibilidad obtenido en nuestras de terminaciones de insulina y proinsulina nos hizo desistir de la valoración de las muestras basales, ya que podríamos incu rrir en cierto error en determinados casos (cifras basales - bajas).

La necesidad de expresar los valores en ng/ml nos ha obligado traducir en dicho estudio, los valores de Insulina a ng/ml también, única forma de obtener los porcentajes - de la primera sobre la segunda.

Las cifras de Proinsulina más elevadas aparecen a los 30' de la sobrecarga observándose como a los 60' des cienden para volver a elevarse de nuevo a los 90 y 120', aunque quedan do por debajo de los valores obtenidos a los 30'.

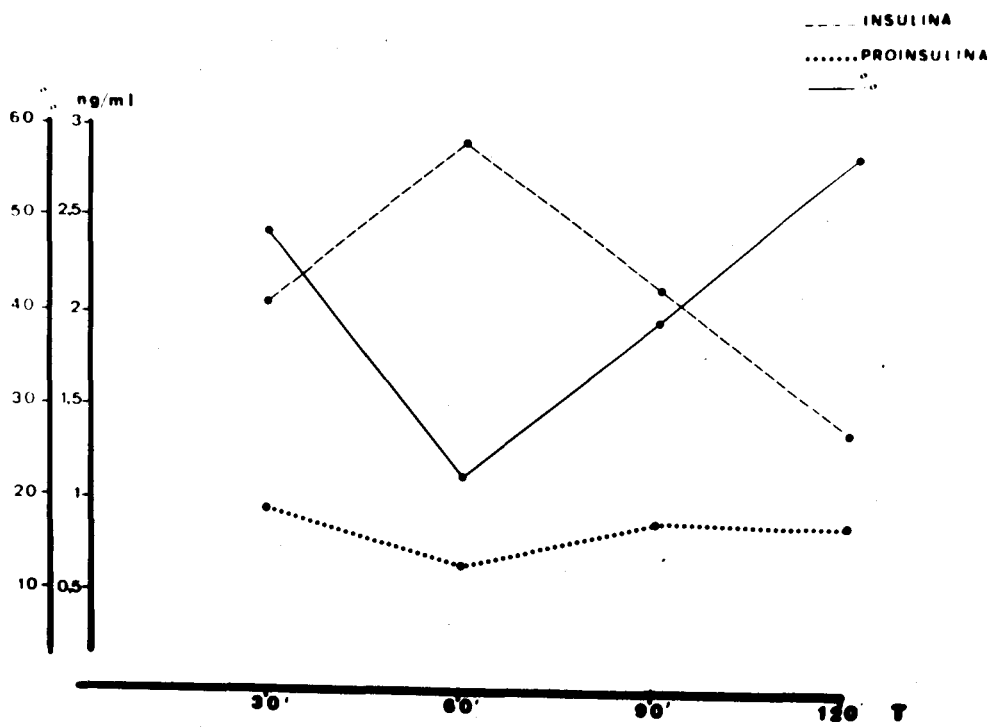
Similarmente sucede con los porcentajes de proinsulina sobre insulina, Mas en ellos el valor máximo se alcanza a los 120'.

Los valores medios, así como sus desviaciones "stan dar" de Insulina y Proinsulina y Porcentajes se muestran en el cuadro X.

La figura 9 corresponde al gráfico de dispersión - obtenido al correlacionar los valores de Proinsulina a Insulina, de cada sujeto en ng/ml. El coeficiente de correlación obtenido fue $-r = 0,13$, mostrando pues una correlación positiva pero de muy bajo grado y sin significación estadística.

- Cirróticos Normales -

Los resultados son semejantes al grupo de Normales,



SAATCHI BORNHOLD

FIG. 8

SUJETOS NORMALES ng/ml

		30'	60'	90'	120'
INSULINA	M	2,05	2,91	2,11	1,36
	DS	±0,65	±1,22	±1,04	±0,30
PROINSULINA	M	0,96	0,54	0,82	0,81
	DS	±0,20	±0,14	±0,45	±0,33
%	M	48,62	39,95	39,99	57,96
	DS	±10,99			

CUADRO X

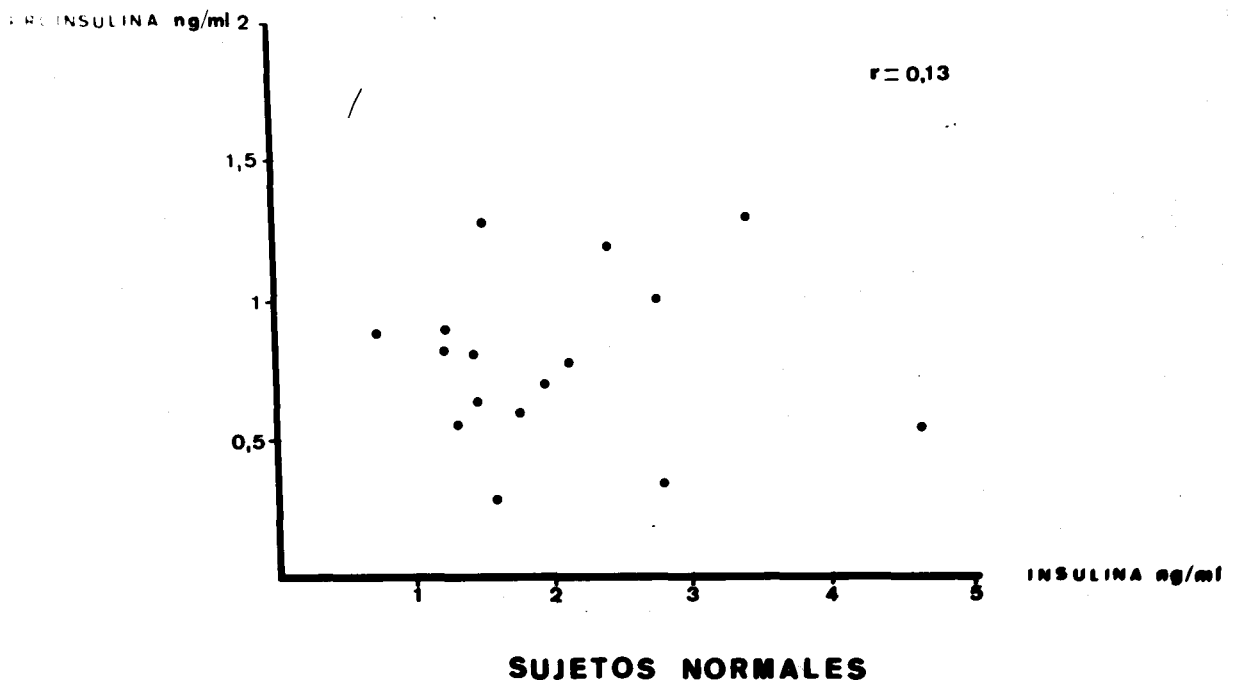


FIG. 9

excepto algunas variantes como puede apreciarse en la figura 10.

La actividad proinsulinica sufre un evidente descenso a los 60' para elevarse de nuevo a los 90', esta vez -- por encima de los valores de 30'; y caer de nuevo a cifras inferiores a estas últimas.

Los porcentajes de Proinsulina descienden tambien mucho a los 60' para elevarse de nuevo por encima de la basal a los 90' y 120'.

En el cuadro XI aparecen los valores medios de Insulina, Proinsulina y porcentajes (%) obtenidos en cada grupo y los resultados de significancia estadística entre las cifras encontradas en los Sujetos Normales y en los Cirróticos no Diabéticos.

Destacan en este sentido, diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los niveles proinsulinicos de ambos grupos a los 90', siendo superiores los de los cirróticos no Diabéticos. También resultan diferentes los porcentajes a los 30' pero aqui son los Sujetos Normales los que ofrecen cifras mas altas ($P < 0,01$).

El estudio de correlación entre Proinsulina e Insulina (Fig. 11) es aun de menor grado: $r = 0,08$ ($P : N.S.$) en este grupo.

- Cirróticos Diabéticos.

La figura 12 muestra como al igual que en la insulina el punto de mayor nivel de proinsulina es a los 90'. Los valores aumentan progresivamente desde los 30', para luego - descender a los 120' por debajo del primer punto (30').

En los porcentajes, el punto máximo se encuentra a los 30' y luego estas descienden para alcanzar a los 120' el valor más bajo.

El cuadro XII presenta los valores numericos de la figura anterior así como el estudio estadístico de las dife-

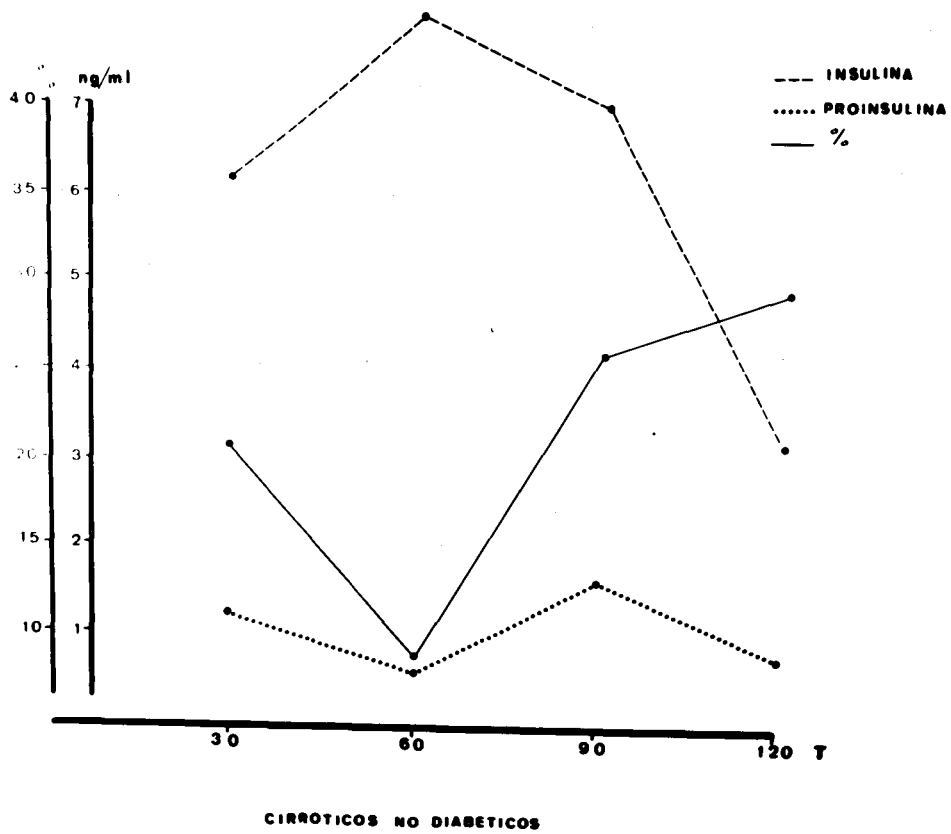


FIG. 10

CIRROTICOS NO DIABETICOS ng/ml

		3.0'	6.0'	9.0'	12.0'
INSULINA	M	6,04	7,90	6,80	3,26
	DS	± 3,33	± 1,83	± 3,39	± 1,89
	P <	NS	NS	0,05	NS
PROINSULINA	M	1,16	0,51	1,58	0,77
	DS	± 0,45	± 0,32	± 0,11	± 0,04
	P <	NS	NS	0,05	NS
%	M	20,20	7,10	26,45	29
	DS	± 3,67	± 5,79	± 15,90	± 16,38
	P <	0,01	NS	NS	NS

CUADRO XI

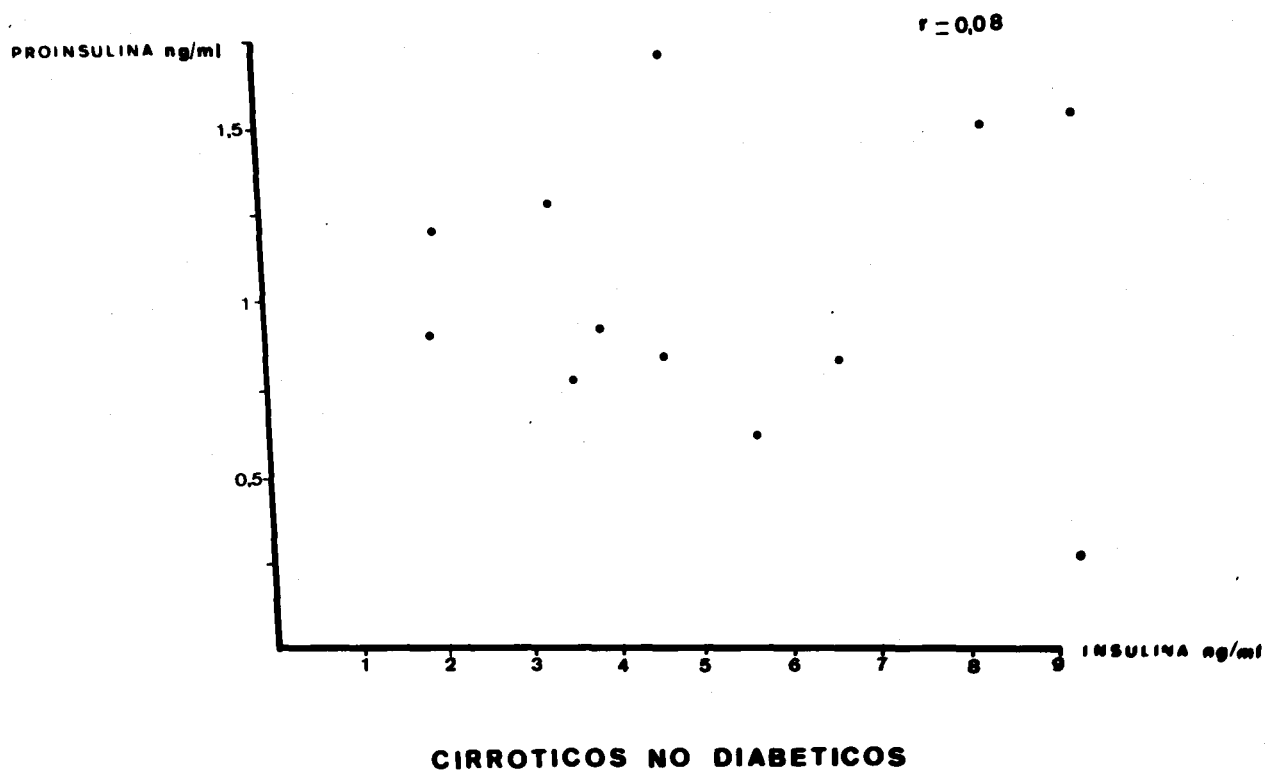


FIG. 11

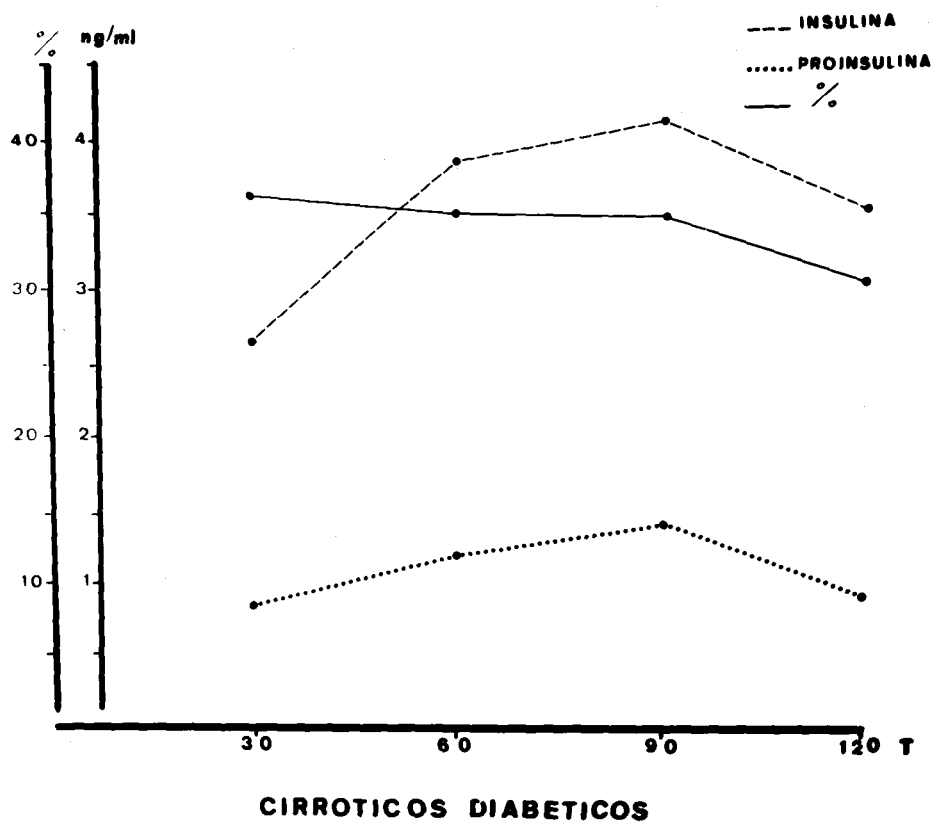
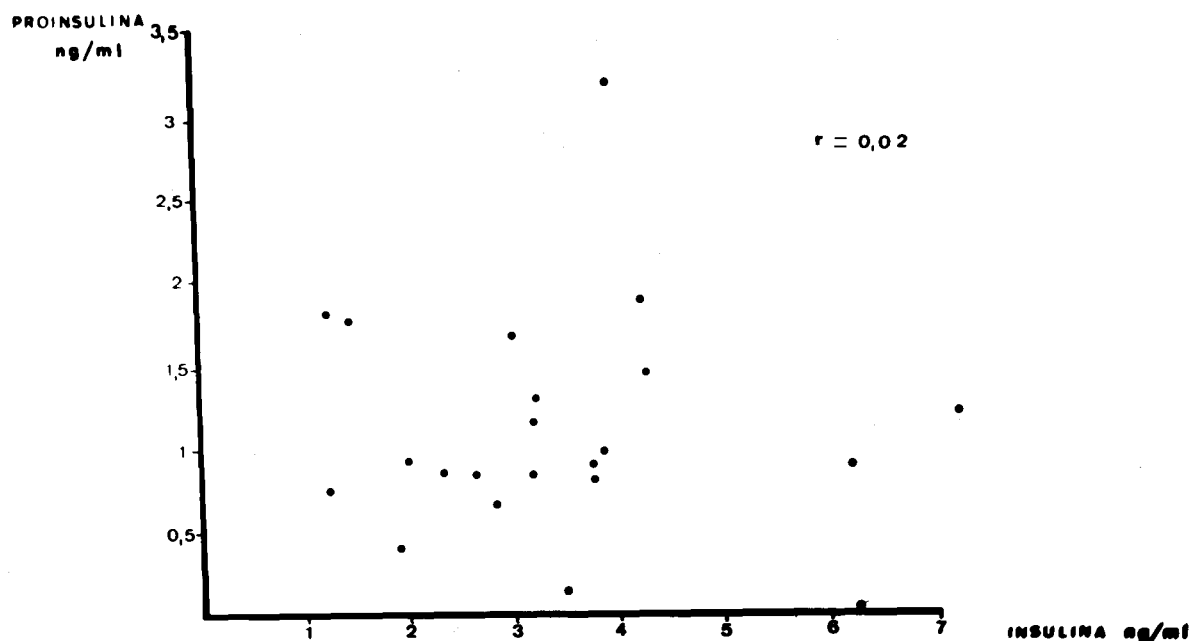


FIG. 12

CIRROTICOS DIABETICOS ng/ml

		30'	60'	90'	120'
INSULINA	M	2,60	3,82	4,19	3,54
	DS	±1,09	±1,34	±2,05	±2,07
	P <	NS	NS	NS	NS
PROINSULINA	M	0,87	1,24	1,47	0,93
	DS	±0,37	±1,02	±1,26	±0,60
	P <	NS	NS	NS	NS
%	M	36,78	35,45	35	31
	DS	±13,60	±26,15	±14,09	±22,58
	P <	NS	NS	NS	0,05



CIRROTICOS DIABETICOS

FIG. 13

P-CIRROTICOS NO DIABETICOS - CIRROTICOS DIABETICOS

	30'	60'	90'	120'
PROINSULINA	NS	NS	NS	NS
%	NS	NS	NS	NS

rencias existentes entre dicho grupo y el de los normales. Solo aparecen significativas la de los porcentajes a los 120°.

El grado de correlación obtenido, como muestra la figura 13, es casi nulo y sin significatividad estadística ($r = 0,02$).

- Cirroticos Normales y Cirroticos Diabéticos.

El estudio de las diferencias entre ambos grupos, cuadro XIII, muestra que estas no son lo suficientemente importantes como para ofrecer significatividad en ninguno de los parámetros ni puntos estudiados.

V) Hormona de Crecimiento plasmática (HGH) .- La figura 14 - cuadro XIV muestra los valores basales así como el comportamiento medio de los valores de HGH en la prueba de sobrecarga oral de glucosa:

a) Normales y Cirróticos.- Los valores basales obtenidos en los sujetos normales, son mas bajos que los obtenidos en los pacientes cirróticos ($P < 0,05$), y la diferencia entre ambos grupos, se hace mucho mas manifiesta, cuando examinamos su comportamiento ante la glucosa. Los normales, bajan progresivamente hasta valores de 0,20 ng./ml, mientras que los cirróticos comienzan a elevar sus cifras, terminando al final de la prueba, con cifras muy superiores a las basales. Si bien presentamos solo los valores medios representativos de cada grupo, a pesar de la dispersión obtenida, los valores individuales mostraron como los Cirróticos el mismo comportamiento, aunque partiendo cada uno de sus cifras basales.

La diferencia de ambos grupos es muy ostensible como puede apreciarse por las significatividades obtenidas ($P < 0,05$; 0,001; 0,01; 0,01).

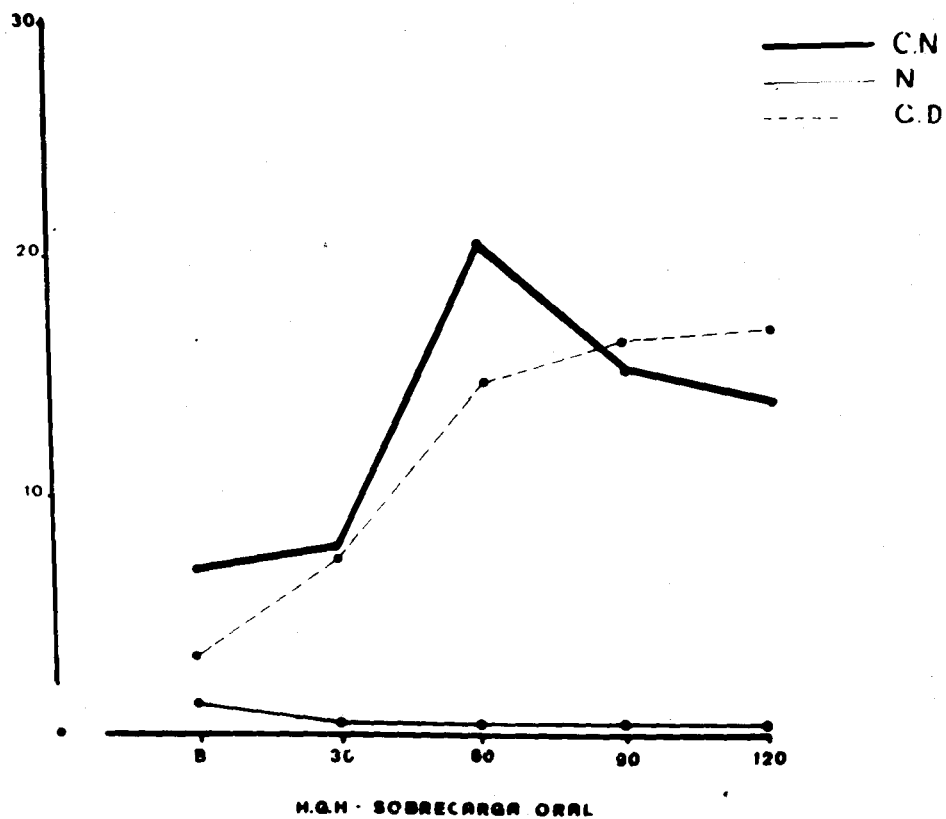


FIG. 14

		H. G. H. ng/ml.						
		0	30	60	90	120		
SOBRECARGA ORAL	M	1,18	0,44	0,24	0,26	0,20		
	DS	±1,25	0,63	±0,39	±0,35	±0,30		
C. DIABETIC.	M	3,25	7,51	14,86	16,46	16,70		
	DS	±1,67	±6,74	±6,32	±10,94	±12,15		
C. NORMALES	M	6,90	7,65	20,50	15,50	14,00		
	DS	±4,38	±6,15	±0,70	12,02	15,55		
	P <	0,05	0,05	0,001	0,01	0,01		
SOBRECARGA I. V.		0	10	20	30	40	50	60
CONTROLES	M	0,84	0,44	0,39	0,37	0,46	0,42	0,30
	DS	±0,28	±0,43	±0,29	±0,19	±0,35	±0,34	±0,30
C. DIABETIC.	M	3,10	1,83	2,30	10,98	12,51	13,95	14,30
	DS	±1,51	±0,80	±1,31	±10,69	±11,18	±13,64	±12,80
C. NORMALES	M	13,6	12,36	13,30	22,13	23,56	23,30	19,80
	DS	±10,17	±13,18	±14,22	±17,00	±14,60	±9,46	±4,80
	P <	0,05	N.S	N.S	N.S	0,02	0,02	0

b) Cirróticos normales y Cirróticos diabéticos.- Cuando se comparan los dos grupos de Cirróticos entre si, aunque existía un discreto predominio de los valores de los Cirróticos no diabéticos esta no fue significativo.

B)- Sobrecarga intravenosa de Glucosa.

I) Glucemia.- La representación gráfica del comportamiento de los diferentes grupos, se representa en la fig. 15 y los valores obtenidos en el cuadro IV.

Se puede apreciar, como el descenso de los valores de glucemia, desde un punto máximo obtenido a los 10 minutos, es mas acentuado a lo largo del tiempo observado en el grupo de sujetos normales, luego en los cirróticos normales y por último en los cirróticos diabéticos.

Todavía más demostrativo, resulta el análisis de los valores Kg, que coinciden con la interpretación de las curvas orales para la clasificación de los pacientes en las diferentes grupos. Los sujetos normales, presentan valores muy superiores a los de los cirróticos normales, y cirróticos diabéticos ($P < 0,01$ y $0,01$). La diferencia de estos dos últimos grupos es también neta ($P < 0,02$) en favor de los primeros, aunque estos presentan una media en los límites inferiores de la normalidad.

II/ Insulinemias.- La respuesta insulínica del grupo de los cirróticos normales, es muy superior a la obtenida en los controles y en los cirróticos diabéticos, partiendo también de valores basales más elevados, (fig 15, cuadro XVI) como sucedía, en la prueba de sobrecarga oral.

En cambio, el grupo de cirróticos diabéticos, muestra una cifras algo superiores a las de los controles, aunque sin diferencia estadística significativa entre ambos.

— C.N
- - - C.D
— N

GLUCEMIAS IV

INSULINEMIAS IV

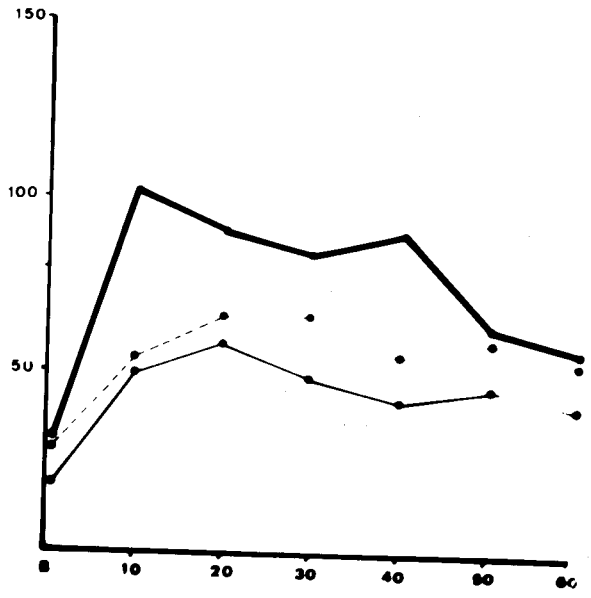
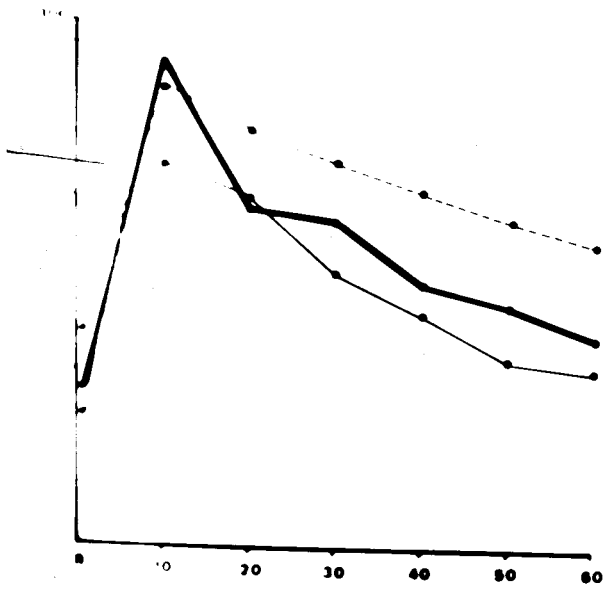


FIG. 15

GLUCEMIAS

	B	10°	20°	30°	40°	50°	60°	K	
NORMALES	M	0,77	2,22	2,13	1,60	1,37	1,11	1,05	1,97
	DS	±0,10	±0,006	±0,10	±0,11	±0,5	±0,12	±0,24	±0,29
DIABETICOS N	M	0,89	2,76	2,09	1,88	1,50	1,40	1,20	1,05
	DS	±0,18	0,76	0,25	0,45	0,24	0,31	0,35	±0,17
DIABETICOS D	M	1,20	2,65	2,37	2,20	2,05	1,90	1,77	1,00
	DS	±0,40	0,49	0,31	0,24	0,33	0,38	0,38	±0,28

CUADRO XV

INSULINEMIAS

	B	10°	20°	30°	40°	50°	60°	
NORMALES	M	12,66	53,33	61,00	51,33	42,66	47,00	41,60
	DS	±4,04	±18,23	±10,81	±6,50	±1,15	±17,34	±1,52
DIABETICOS N	M	29,66	104,66	92,66	84,33	90	62,3	56,6
	DS	±10,9	±50,10	±53,01	±60,66	±30,03	21,2	40,1
DIABETICOS D	M	27,8	53,40	66,4	67,60	55,40	60,80	42
	DS	±10,5	±22,7	±30,6	±40,20	±30	±30,2	±30
	P <	0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

CUADRO XVI

III/H.G.H.- Las cifras basales obtenidas (fig.16 cuadro - XIV) son similares a las de la sobrecarga oral, así como, el comportamiento de todos los grupos.

Los sujetos normales controles, descienden desde $0,84 \pm 0,28$ ng/ml hasta $0,80 - 0,30$ ng/ml, mientras que los cirróticos ascienden a cifras muy importantes.

Debemos resaltar también que aunque con desviaciones "standards" amplias en algunos de los puntos, el comportamiento de todos los enfermos cirróticos fue idéntico, en lo que a valores crecientes se refiere; ello hace posible obtener diferencias significativas a los 40, 50 y 60 minutos ($P < 0,02, 0,02, 0,02$).

Los cirróticos diabéticos mostraron valores medios inferiores a los de los cirróticos normales aunque no significativos.

IV/ Correlación entre incremento de H.G.H. (constante de asimilación de glucosa), Los gráficos de dispersión en la fig. 17, muestran la correlación de estos dos parámetros en los pacientes cirróticos; en el de la izquierda, se expresan los incrementos de H.G.H. en % sobre los valores basales, y en el de la derecha ng/ml. Los coeficientes obtenidos fueron $r = +0,20$ y $r = 0,01$, respectivamente; mostrando pues, una correlación negativa de muy escaso valor y sin significatividad; y no correlación, en la segunda forma de expresión.

V/ Correlación entre incremento H.G.H. y proteínas totales y albumina plasmática. Las Fgs. 18 y 19, presentan la distribución de los pares de valores obtenidos en los pacientes cirróticos, al correlacionar tanto los porcentajes de los incrementos de H.G.H. en % y en ng/ml, sobre las basales y las proteínas totales y albúmina plasmática, así como los coeficientes de correlación obtenidos, y su significatividad estadística -

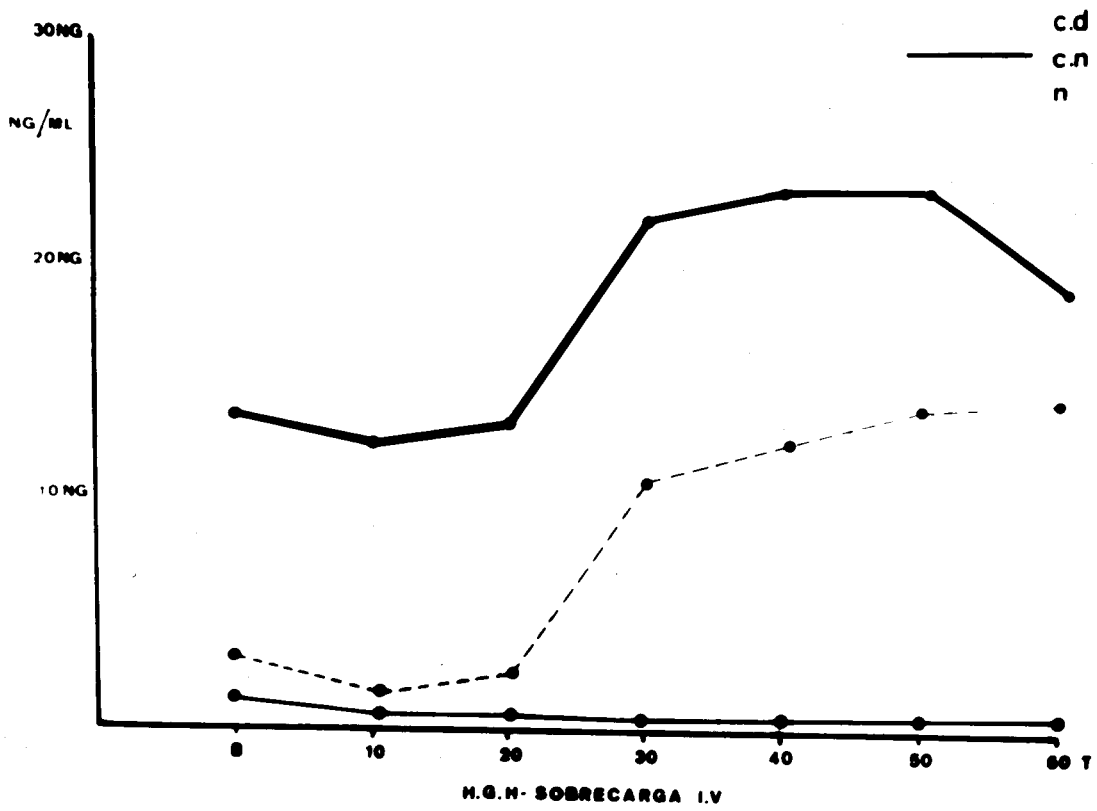


FIG. 16

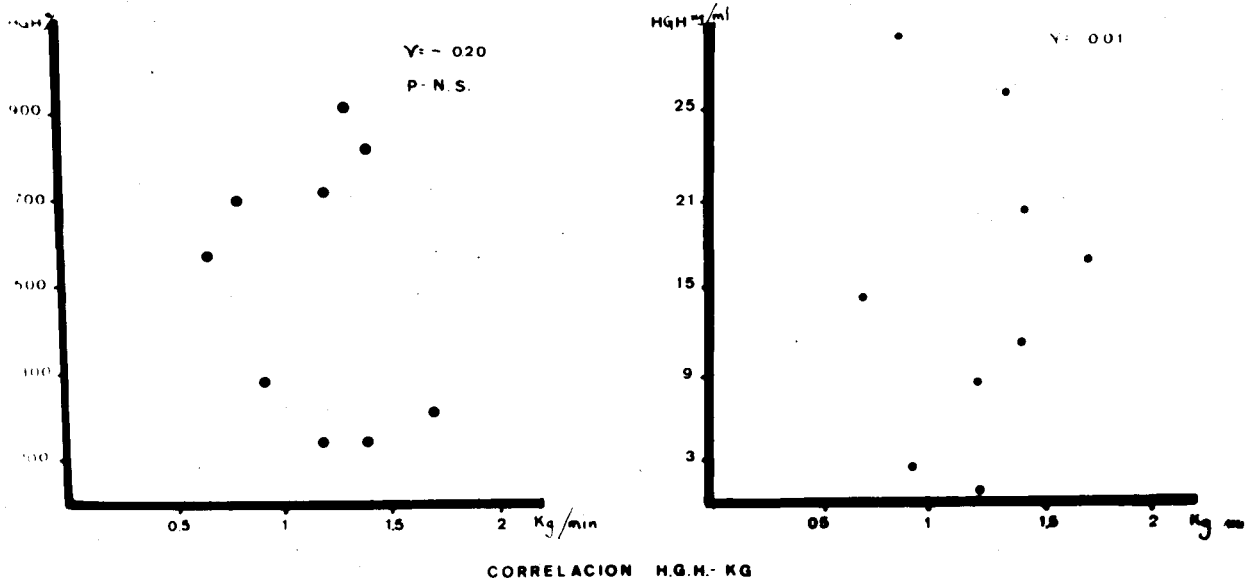


FIG. 17

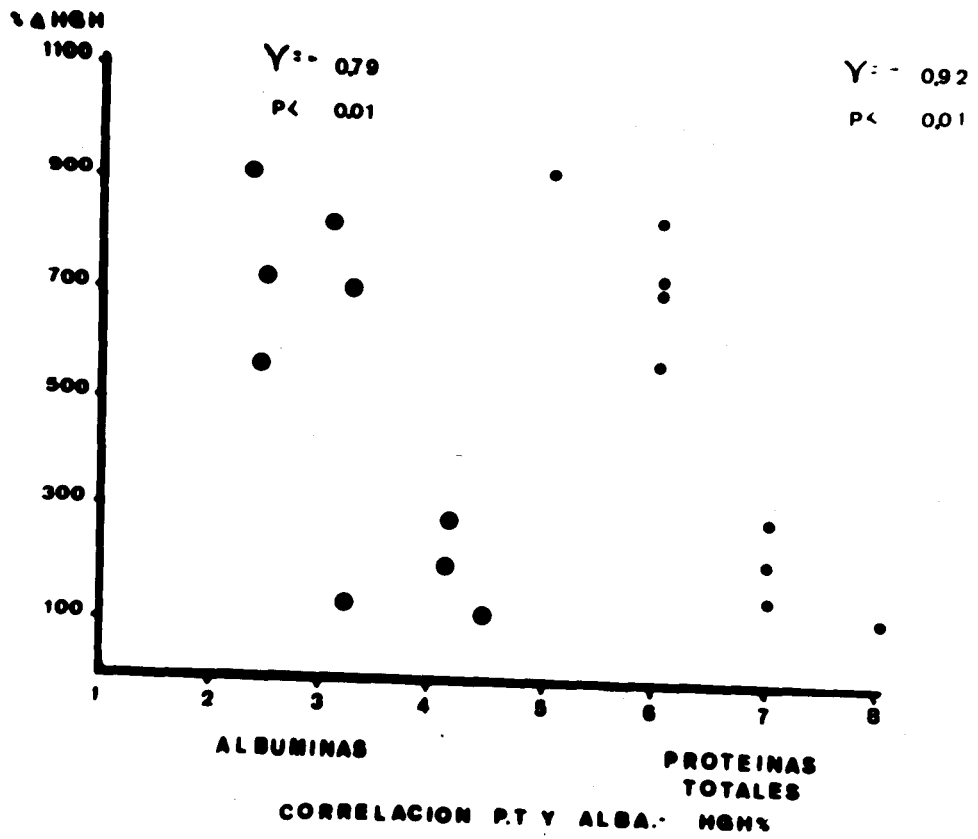


FIG. 18

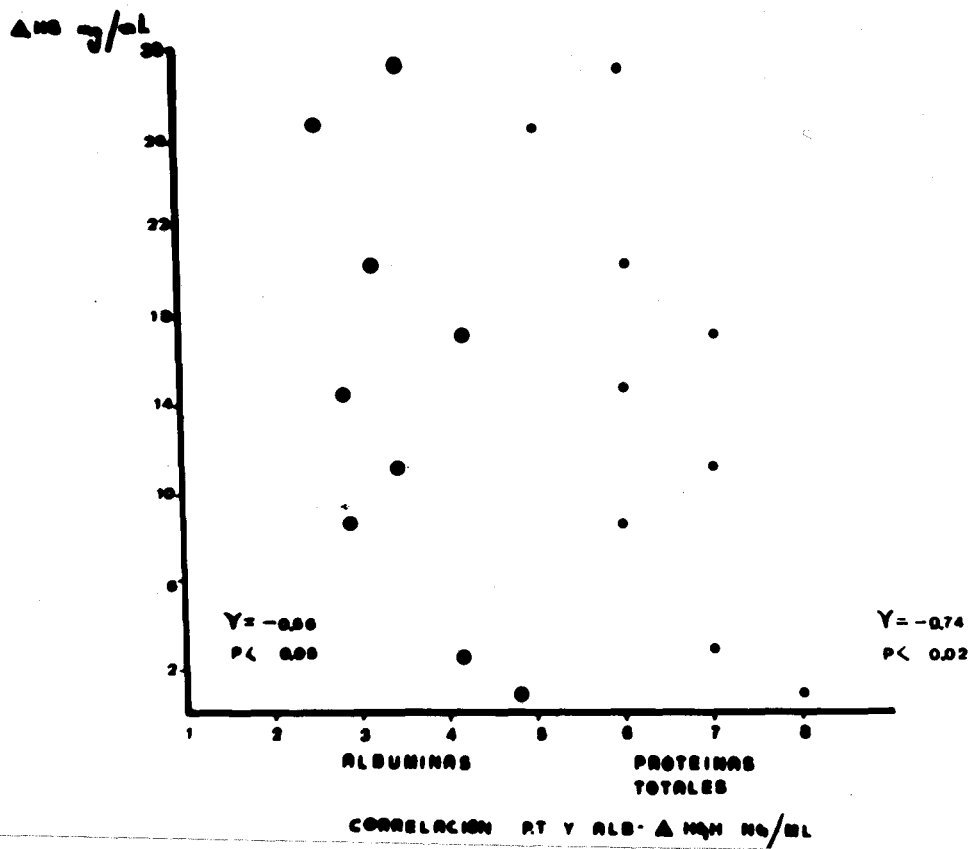


FIG. 19

($r = -0,92$, $P < 0,01$; $r = -0,72$, $P < 0,01$; $r = -0,74$, $P < 0,02$; $r = -0,56$, $P < 0,05$).

VI) Cortisol plasmático.-Los valores basales, así como las cifras observadas a lo largo de la sobrecarga intravenosa en los distintos grupos, se muestran en la figura 20, cuadro XVII.

Las basales del grupo de pacientes cirróticos son más altas que aquellas obtenidas en el grupo de sujetos controles ($P < 0,05$), aunque dentro de los límites de la normalidad. Los cirróticos normales presentaron una medida más baja que los cirróticos diabéticos mas dicha diferencia no fue significativa.

El análisis del comportamiento del cortisol plasmático en los distintos grupos a lo largo de la sobrecarga intravenosa muestra que tanto los sujetos controles como los cirróticos normales responden con un incremento sobre sus cifras basales, alcanzando valores máximos a los 40 y 50 minutos, -- mientras que en los cirróticos diabéticos disminuye los valores a lo largo de la prueba.

La diferente respuesta de los cirróticos normales y los cirróticos diabéticos, hace que al compararse el grupo de cirróticos con el de sujetos controles, no aparezcan diferencias significativas mas que en basal y a los 10 minutos.

Similar a lo sucedido con la Hormona de Crecimiento, ocurre con el Cortisol, cada paciente de cada uno de los grupos, presentó el mismo comportamiento observado en los valores medios, aunque cada uno partía de sus basales individuales.

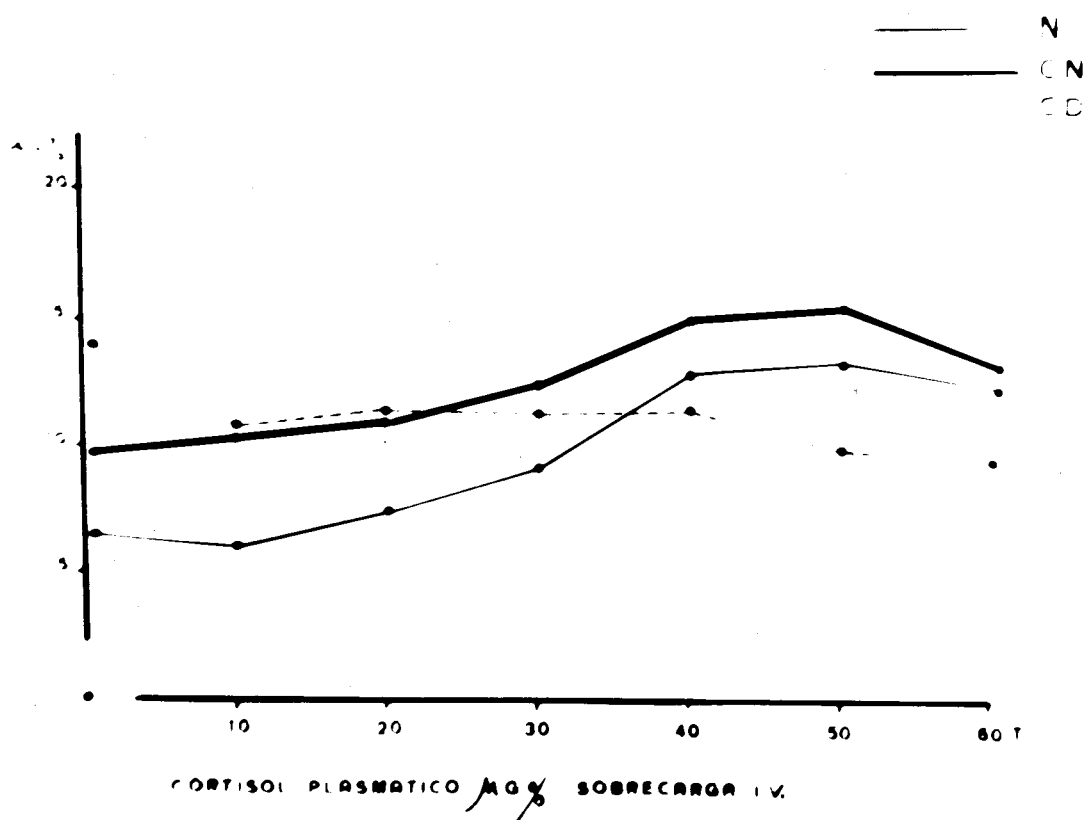


FIG 20

	CORTISOL $\mu\text{g} \%$ ml.							
	8	10	20	30	40	50	60	
NORMALES	M	6,56	6	7,34	9,36	13,04	13,24	12,24
	DS	$\pm 2,60$	$\pm 2,96$	$\pm 3,98$	$\pm 4,48$	$\pm 5,41$	$\pm 5,43$	$\pm 4,04$
	P <	0,05	0,02	NS	NS	NS	NS	NS
CIRR. NOR.	M	10,98	10,53	11,20	12,53	15,15	15,73	13,46
	DS	$\pm 0,46$	$\pm 1,22$	$\pm 1,61$	$\pm 2,05$	$\pm 3,00$	$\pm 4,38$	$\pm 8,82$
	M	14,44	10,49	11,24	11,68	11,88	10,84	9,6
CIRR. DIA.	DS	$\pm 6,29$	$\pm 3,34$	$\pm 4,85$	$\pm 5,12$	$\pm 5,16$	$\pm 5,92$	$\pm 4,46$

CUADRO XVII

C A P I T U L O I V

Comentarios sobre los resultados obtenidos.

COMENTARIOS A LOS RESULTADOS OBTENIDOS

A.- Intolerancia a la sobrecarga de glucosa.

El análisis a los resultados, muestra una elevada proporción de intolerancia a la sobrecarga de glucosa en el grupo de nuestros pacientes cirróticos, ya que solo tres de los catorce estudiados, presentaron unos valores glucémicos (tras sobrecarga oral e intravenosa), en los límites inferiores de la normalidad, mientras que los once restante, mostraron un comportamiento muy similar a los del grupo diabéticos de madurez, y que corresponde a un 21% de normalidad glucémica, y a un 79% de anormalidad en el grupo de cirróticos hospitalarios avanzados.

Esta alta proporción de intolerancia hidrocarbónica en cirróticos, ha sido asimismo demostrada por otros autores MAGYESI (73), SCHREIBER (74), FELDER (75), CONN (76) COLLINS (77), en estos últimos años, utilizando parámetros clasificatorios semejantes a los que hemos utilizado en el presente estudio, punto fundamental para comparación de resultados.

Estos porcentos que pueden parecer elevados a una consideración superficial y simplicista tal como cifras basales al uso, con técnicas corrientes, que tienen un gran margen de error (se considera que pueden llegar hasta 80mmg. de error comparadas con técnicas biológicas); no le resultan -- cuando se utilizan parámetros de mayor garantía.

Por tanto pues, el 79% de los cirróticos estudiados, presentaban una intolerancia a la sobrecarga de glucosa semejante a la que muestran los diabéticos de la madurez.

Muchos son los factores ya señalados que pueden -- influenciar sobre dicha intolerancia entre los que figuran:

a) En primer lugar, la influencia de un higado con una capacidad de asimilación de hidratos de carbono disminuida, bien

sea debido, a la propia insuficiencia del hepatocito, o a la deficiencia de irrigación de éste.

MADISSON (78) estudiando el efecto de anastomosis portocava en perros, estimó que un 25% aproximadamente de una sobrecarga intravenosa intensa de glucosa, era aclarada por el hígado, mientras que BONDY (79) y cols. demostraron una menor capacidad hepática en sobrecarga semejante.

No obstante, los estudios de AZERAD (80) demostraron, que no existían cambios de tolerancia a la glucosa después de la anastomosis portocava en pacientes hepáticos tributarios de dicha intervención.

En nuestros pacientes, a semejanza de los presentados por COLLINS (77), no existió paralelismo, entre gravedad clínico-analítica del proceso hepático y la tolerancia a hidrocarbonada.

b) Otro factor señalado SALID (81) y CONN (82), es la Hipokaliemia acompañante en muchas ocasiones de la cirrosis hepática. En los enfermos estudiados solo uno mostró una cifra de potasio en plasma de 3 mEq, encontrándose las demás dentro de los límites de normalidad. Ya es conocido, que las cifras plasmáticas de este elemento en muchas ocasiones, no es expresión de la concentración intracelular, y es esta la que podría influenciar el comportamiento anómalo de los diferentes tejidos, por ello nos hemos permitido la licencia de no presentar nuestras cifras plasmáticas ni estudiar su posible influencia. En experiencias ya realizadas por COLLINS (83), se demostró como la asimilación de glucosa no mostraba variación alguna al elevar el contenido corporal de potasio en este tipo de pacientes.

Por este mismo autor(83) fue demostrada la falta de influencia de otros factores tales como: magnesio y fósforo plasmático.

- c) Ninguno de nuestros cirróticos, fueron sometidos antes del estudio a tratamiento diurético ni a corticosteroides, eliminando así la posible acción de estos fármacos.
- d) Podía tratarse de sujetos genéticamente afectados, aunque hemos indicado la carencia de antecedentes familiares, A pesar de lo expuesto, lo que resulta muy evidente es que la proporción de diabéticos dentro de la población general oscila de 1-10% dependiendo de los criterios diagnósticos, y de la edad de los sujetos (BUTTERFIELD) (84), y que dicha proporción se eleva extraordinariamente en el grupo de los cirróticos estudiados por nosotros, y en aquellos de los autores anteriormente señalados. Es por ello que: o bien, la cirrosis hepática se origina con mucha frecuencia en -- aquellos sujetos marcados genéticamente como diabéticos, en cuyo caso los antecedentes familiares, debían presentarse con mayor frecuencia (ninguno de nuestros pacientes presentaban datos en este sentido), o la cirrosis hepática conduce a una situación metabólica, en un elevado número de pacientes, similar a la Diabetes Mellitus de la madurez.

B.- Insulinemias después de sobrecargas de glucosa.-

Resultan interesantes, los hallazgos desprendidos del análisis de las cifras de insulinemias absolutas o relativas al estímulo de sobrecarga de glucosa.

- I) Tras la sobrecarga oral de glucosa, apreciamos como el grupo de cirróticos con una tolerancia hidrogenocarbónica normal, muestra cifras de insulina muy superiores a los sujetos -- controles y a la de los cirróticos diabéticos, coincidiendo con ello con SAMAN (85) y MAGYESI (73), mientras que estos últimos a su vez, presentan insulinemias superiores a los controles y a los diabéticos de madurez.

Pero este patrón de respuesta, se modifica intensamente, cuando se observa el comportamiento de los diferentes grupos, ante un mismo grado de estímulo $\frac{\Delta \text{Insulina}}{\Delta \text{Glucemia}}$, y en esta situación, se puede apreciar, como los cirróticos normales, responden con mucha mayor cantidad de insulina que los demás grupos; mientras que los cirróticos diabéticos y los diabéticos, lo hacen en mucha menor cuantía que los normales, presentando entre ellos una escasa diferencia no significativa estadísticamente. Datos similares han sido presentados por SAMAN (85) y COLLINS (83).

Por tanto pues, el cirrótico ^{normal} responde al estímulo de sobrecarga de glucosa con una hipersinsulinemia.

En el análisis de hiperinsulinismo de los cirróticos normales, surgen dos posibilidades patogenéticas:

- a) Como el hígado tiene capacidad para degradar insulina, y se constituye en el ser humano como uno de los órganos fundamentales en dicha misión TOMIZAWA (86), las cifras observadas, podría ser traducción de una hipofunción hepática, y por tanto una disminución en la destrucción de la insulina circulante. Dicha hipótesis fue estudiada por COLLINS (83), el cual inyecta insulina a pacientes cirróticos, y observa el tiempo medio de desaparición de dicha insulina; resultando este, idéntico al obtenido en sujetos controles; y al presentado por TOMASI y cols. (87) en sujetos normales y diabéticos. Por tanto no parece muy probable dicha consideración.
- b) Así pues, parece lógico, pensar, que el hiperinsulinismo sea debido a una hipersecreción por parte de las células beta pancreática: bien primariamente, o secundariamente, por serles solicitado por la periferia; quedando aún una tercera posibilidad, como es la secreción en cantidades aumentadas de Proinsulina conjuntamente con la insulina, ya que al determinar ésta en el análisis radioinmunoológico, resultan indiferenciables, y se dosifican conjuntamente.

Si consideramos ahora, el hipoinsulinismo obtenido en los cirróticos diabéticos, surgen también varias posibilidades interpretativas:

- 1) Ha sido ya descrito por PETERS y cols. (89), un estado de deficiencia insulínica en pacientes con pancreatitis crónica.

Si bien es escaso el número de nuestra experiencia en estas exploraciones practicadas en sujetos que un año, dos ó más años han padecido parotiditis aguda viral (dos casos); y dos de pancreatitis aguda del adulto, las cifras de insulinemia fueron normales.

Aunque nuestros enfermos no presentaban ningún episodio clínico compatible con pancreatitis aguda, ni esteatorrea manifiesta, no podemos descartar dicha posibilidad, debido a la frecuencia con que se inserta la patología crónica pancreática en pacientes portadores de cirrosis de LAENNEC; excepción hecha de la hemocromatosis.

- 2) Que realmente la célula beta respondiese ante el estímulo de glucosa con hiporespuesta, bien fuera debido, a la misma causa no conocida, y condicionada genéticamente, en cuyo caso estaríamos ante auténticas diabetes Mellitus, o bien que las alteraciones metabólicas del cirrótico condicionasen una anomalía del sistema efector de la célula, propio de dicha afección.
- 3) El déficit de respuesta por parte de la célula beta, sería secundaria a una deficiencia de los factores gastrointestinales de estimulación (gastrina, pancreozimina, enteroglucagón) y el factor humoral intestinal todavía no conocido que pone en marcha la liberación de insulina del páncreas, y cuyas influencias no ofrecen dudas en la actualidad McINTIRE (88). Conocido de todos, es la frecuencia con que se producen lesiones macro - y microscópicas acompañadas de trastornos de función en el aparato gastrointestinal de -

de los pacientes cirróticos, y es por eliminar dichos factores, por lo que se realizaron las sobrecargas intravenosas.

II) Los resultados insulínicos obtenidos tras la sobrecarga intravenosa de glucosa, siguen mostrando hiperinsulinemia en el grupo de los cirróticos normales, cuando se comparan sus cifras con el grupo de sujetos controles. En cambio, los cirróticos diabéticos, muestran un comportamiento diferente al observado en la sobrecarga oral. Aunque la respuesta es inferior a la de los cirróticos normales, es discretamente superior a la de los controles tanto en valores absolutos como en los relativos. Así pues, estos podrían ser datos favorables, en el sentido del apartado 3, considerado ultimamente. Hallazgos de este tipo han sido presentados por COLLINS (77).

C) - Asimilación de la glucosa relacionada con la insulinemia. Si analizamos ahora en conjunto, los datos de glucemia e insulinemia obtenidos, podemos deducir, que la insulina segregada por los cirróticos normales, no realiza una acción efectiva en lo que a asimilación de glucosa se refiere, ya que el desarrollo de ambas sobrecargas presentan cifras de glucemia más altas y un Kg más bajo. Algo similar sucede con la sobrecarga intravenosa en cirróticos diabéticos, Kg. bajas, e insulinemias que debían de ser suficientes para una asimilación mucho más efectiva.

Es pues claro, que la insulina segregada es menos efectiva, y esto puede ser debido o bien, a que intimamente su estructura molecular, es diferente a la insulina de los sujetos normales; y es interesante tener en cuenta aquí la posibilidad de secreción de Proinsulina STEINER (90), p "big-insulin" GORDEN (91) en mucha mayor propor-

ción que en el sujeto normal, y con menor actividad biológica (diez a veinte por ciento), lo que podría explicar los altos niveles insulinémicos obtenidos y la escasez de efectos.

D) Niveles Proinsulinicos plasmaticos.-

La actividad biológica de la proteasa aislada en nuestro laboratorio, (destrucción de un 95% de la insulina -- presente y un 5% de proinsulina), así como los resultados obtenidos, -a través de nuestro sistema radioinmunológico, utilizando anticuerpo anti-insulina, Insulina porcina I¹²⁵, y proinsulina porcina como "standard"-, en las pruebas de Recuperación y reproductibilidad, nos permitió utilizar el método que nos propusimos con toda garantía en el estudio de valoración de niveles de Proinsulina plasmática.

Los resultados obtenidos en sujetos normales muestran que los niveles de Proinsulina, son similares a lo largo de la prueba de sobrecarga, apreciándose un ligero descenso a los 60'. Así pues, no existe paralelismo entre los niveles de Insulina y Proinsulina, ya que las cifras de la primera son máximas a los 60' y luego descienden mientras que en la segunda se ofrecía un ligero ascenso, tanto a los 90, como a los 120'. Dicha falta de correlación, se aprecia también al analizar la dispersión existente (gráfico de dispersión) entre los distintos valores de proinsulina e insulina individuales y el grado obtenido para el coeficiente de correlación:

$$r = 0,13.$$

Los valores de los porcentajes, están fundamentalmente condicionados por la dinámica segregatoria insulinica -- mas que por la de proinsulina, ello coincide con los datos -- aportados por los diversos autores KITABCHI (19) GOLDSMITH(20) MELANI (21).

Aunque los valores de los parámetros que hemos estudiado en esta sección (Insulina, proinsulina, y porcentajes)

Los hemos presentado en forma de valores medios en aras de -- una mayor brevedad, al analizarlos aisladamente en cada uno -- de los constituyentes del grupo, aparece una discreta diver-- gencia expresión de un factor secrecional proinsulinico indi-- vidual, que aunque generalmente parece seguir a aquel expues-- to por los valores medios, en algunos casos difiere de él.

De todas formas, es interesante señalar como ya an-- tes lo hiciera MELANI (21) GOLDSMITH (20), que los porcenta-- jes de Proinsulina e insulina plasmática encontradas difieren ostensiblemente de aquellos encontrados en el pancreas, en el cual solo aparece un 1 ó 2% de Proinsulina con respecto a las cifras de insulina. Son pues muy sugerentes las importantes -- cifras de Proinsulina en plasma, y ello en el sentido de un -- papel fisiológico determinado para dicha sustancia que aun es-- tamos lejos de conocer; pues si bien ya ha sido establecido -- el papel de la proinsulina dentro de la Célula que seria fa-- vorecer el establecimiento de los puentes disulfuros de la mo-- lecula de insulina, ello no elimina la posibilidad de que la molécula de Proinsulina desarrolle otras importantes funcio-- nes extrapancreaticas, quizás de tipo regulatorio, tal vez en los periodos interingesta.

Es probable que la Proinsulina despues de ser sin-- tetizada en los ribosomas de la celula β , sea transportada y transformada en insulina en el aparato de Golgi, STEINER (17) y LACY (92), y aunque hay todavia escasos datos acerca de la relativa proporción de Proinsulina e Insulina en los gránulos, es posible que los procesos de conversión no sean siempre com-- pletos, y un porcentaje de proteina granular permanezca como Proinsulina. Si ello es así, de la liberación de los gránulos despues de la estimulación de glucosa podria resultar la pue-- ta en circulación de Insulina y Proinsulina que estaria en re-- lación con el grado de maduración del gránulo, puediendo exis-- tir en algunos sujetos una liberación preferencial de granulos de reciente formación o "pregranulos"

En los Cirróticos no Diabéticos, los niveles medios de Proinsulina plasmática en la sobrecarga oral de glucosa han resultado más elevadas que aquellos de los Sujetos Normales, no obstante dicha elevación no es estadísticamente significativa, mas que a los 90', pero dichas elevaciones al ir acompañadas de cifras de insulimias mas elevadas, como veíamos anteriormente, los porcentajes de Proinsulina sobre Insulina resultaron menores especialmente a los 30', ofreciendo en este punto significatividad estadística ($P < 0,01$). Al igual que en los Sujetos Controles se observa un evidente descenso tanto de Proinsulina (ng/ml) como de porcentajes a nivel de los 60'. Tampoco hemos obtenido correlación entre la liberación de Proinsulina e Insulina, en los sujetos pertenecientes a este grupo.

El análisis global de los valores plasmáticos de Insulina, Proinsulina, y porcentajes en el grupo de los Cirróticos no Diabéticos, permite afirmar que en dichos pacientes no existen datos que justifiquen el pensar, que la liberación de Proinsulina, en un porcentaje elevado, con su menor actividad biológica, sea la causa de las altas cifras de Insulina poco eficaz encontradas

Los cirróticos Diabéticos, muestran un comportamiento similar al grupo normal y solo a los 60' presentan cierta --tendencia a ofrecer valores de Proinsulina y porcentajes algo superiores, pero la amplia dispersión obtenida en los constituyentes de este grupo, hace que no exista significatividad entre las diferencias.

La anómala secreción-liberación de Proinsulina, no parece pues que sea factor decisivo en la intolerancia hidrocarbonada que nos ocupa.

No hemos podido comparar nuestros hallazgos, ya que no existe el menor dato en toda la Bibliografía internacional, si bien COLLING y cols.(83) en su último trabajo, hablaban de su posibilidad patogenetica, pero sin que hasta el momento haya mostrado resultados a este respecto.

Así pues, si no existen diferencias manifiestas entre los porcentajes de Insulina y Proinsulina de los Sujetos Normales y los Cirróticos; presentando estas últimas -como veíamos anteriormente- cifras insulínicas suficientes para el desarrollo de un metabolismo hidrocarbonado normal, debe existir una causa, bien a nivel plasmático o tisular, que condicione la falta de respuesta periférica.

E.- Cortisol.

El examen de las dosificaciones de cortisol plasmático muestra valores basales superiores en el grupo cirrótico ($P < 0,05$), aunque si comparamos sus cifras con las obtenidas en nuestro laboratorio con el mismo método en más de sesenta sujetos normales (media $13 \pm 1,9 \mu\text{g}$), sólo el grupo de cirróticos diabéticos, muestra cierta tendencia a presentar valores superiores a estos.

Mayor interés presentan las cifras obtenidas tras la sobrecarga intravenosa pudiéndose apreciar, un comportamiento similar en los sujetos normales y los cirróticos no diabéticos, incrementando ambos grupos sus cifras sobre las basales, mientras que, el grupo de cirróticos diabéticos, las disminuye.

Si consideramos, que la introducción del suero glucosado actuase a modo de "stress" (aunque ningún dato en este sentido aparece señalado anteriormente), podíamos comprender el comportamiento del cortisol, en los grupos de cirróticos normales y controles, pero ello, no sería suficiente para explicarnos el de los cirróticos diabéticos, que deberían comportarse en este caso del mismo modo que los anteriores.

Más, si en cambio atribuimos al efecto de la glucosa introducida sobre el hipotálamo, ello nos podría aclarar, la falta de respuesta de los cirróticos diabéticos, si consideramos, que su deficiente metabolismo hidrocarbonado ofrecería a menudo dichos niveles a los citados centros neuro-endocrinos.

F).- Hormona Somatotrófica (H.G.H.)

Es estrecha, la similitud de los patrones del metabolismo de los hidratos de carbono, en la acroemegalia y la cirrosis de LAENNEC -HED.(93), BODEN (94). En ambas afecciones, la diabetes es altamente frecuente, la tolerancia a la glucosa es baja, CREUTZFELDT (95), MAGYESI(73), SAMAAN (85), BECK (96), los niveles de insulina en ayunas están elevados, y la respuesta insulínica a la ingestión de la glucosa es elevada, CREUTZFELDT (95) MAGYESI(73), BECK (96), KARAN (97). Además de ello, los efectos diabetógenos de la H.G.H. han sido bien establecidos, BECK (96), LUFT (98), KIPNIS (99).

Por todo ello, nos resultó interesante establecer la posible influencia de la citada hormona en el comportamiento de nuestros pacientes cirróticos, pudiendo apreciar, como las cifras basales H.G.H., son más elevadas que en los sujetos controles, coincidiendo en ello, con los datos aportados por HERNANDEZ (100), SAMAAN (85) y CONN (101).

Sin embargo, las cifras más altas, las mostraron el grupo de cirróticos normales, mientras que los autores anteriormente citados las presentan en el grupo cirróticos diabéticos.

Ante las sobrecargas orales intravenosas, todos nuestros cirróticos, respondieron incrementando su valores de H.G.H. - plasmática como veíamos anteriormente, mientras que tras sobrecarga, ^{oral}HERNANDEZ (100), sobre cinco pacientes estudiados, encontró que sólo en uno aparecía una respuesta paradógica; y SAMAAN (85) sobre veintidos pacientes, encontró ^{elevación} o no supresiones en diez y ocho, Finalmente CONN (101), encontró que la mitad de sus quince cirróticos estudiados, elevaban las cifras sobre las basales. Este último autor, tras la sobrecarga intravenosa observó: Como cinco pacientes presentaban disminución sobre sus basales; en cinco no hubo cambio, y en ocho, estas se incrementaron.

Resulta pues muy llamativo, que la sobrecarga de glu9
cosa, que en los sujetos normales se utiliza en las dos prime-
ras horas como prueba de supresión de la secreción de hormona
de crecimiento, en los enfermos cirróticos, no solo no disminu-
ye ésta, sino que la aumenta en un alto grado.

Respuestas paradógicas de este tipo, han sido des--
critas solo en: pacientes acromegálicos (BODEN y cols.94).ROTH
y cols (102); en alteraciones de la regulación hipotálamo-hipó
fisis, (BECK y cols. (103); en Porfiria aguda intermitente --
PELRROTH (104); cánceres metastásicos (SAMAAAN (105); y en mal-
nutriciones severas olKWASHIORKOR. PIMSTONE(106); ninguno de -
nuestros pacientes, eran tributarios de estas causas, aunque -
dejaremos para más adelante el análisis de la última señalada.

El hallazgo de datos expuestos nos plantea varias -
interrogantes:

a) En primer lugar, el posible papel que puede jugar la hormo-
na del crecimiento, en el alto porcentaje de intolerancia -
hidrocarbonada observando en el paciente cirrótico.

Si bien los resultados obtenidos, al correlacionar los dis-
tintos Kg y los incrementos de H.G.H. presentan una casi nu
la relación entre ambos fenómenos, ellos no pueden ser defi-
nitivos, ya que la influencia de la hormona sobre el citado
metabolismo, tendría que efectuarse, a través de la capaci-
dad pancreática de secreción insulínica, constituyéndose és
te pues, en una causa primaria, para el fracaso del organis-
mo cirrótico ante los H. de carbono, y el aumento de hormo-
na de crecimiento, como causa disponente, o desencadenante,
al disminuir la insulina segregada, sea cual fuera su causa,
en un determinado instante.

Si bien el efecto antagónico de la H.G.H. sobre la insulina
se puede ya encontrar a los 10' de su presencia en el siste-
ma insulina-glucosa- tejido, según ZIERLER Y RABINOWITZ(107)

BRONK y FISHER (108), en la mayoría de los estudios "in vivo" es necesario que transcurran de dos a tres horas para que se ponga de manifiesto, la acción de H.G.H. sobre la respuesta tisular a la insulina.

De extraordinario interés en este sentido, resultan las experiencias de BERSON (109), el cual sometió a un grupo de sujetos normales a una sobrecarga oral de glucosa, registrando la respuesta inmediata de insulina, y la respuesta tardía de H.G.H., a partir de las tres horas de empezar la prueba; cuando repitió en los mismos sujetos la sobrecarga hidrocarbonada a las seis horas, pudo observar, que las respuestas insulínicas, fueron muy superiores a la primera para desarrollar el mismo grado de tolerancia de glucosa.

Así pues, los valores de H.G.H. obtenidos en nuestros pacientes, unidos a aquellos correspondientes a la insulina, podrían traducir sea cual sea el tiempo necesario para el desarrollo del citado metabolismo, la posible influencia de la H.G.H., sobre el hiperinsulinismo poco eficaz observado en el grupo de cirróticos normales, y el correspondiente a la sobrecarga intravenosa del grupo de cirróticos diabéticos, menos eficaz aún, ya que las dietas de protección hepática (rica en H. de carbono, y con tomas frecuentes) condicionarían casi un estado de insulinoresistencia a lo largo de todo el día.

b) No presenta menor interés pues, el análisis de las posibles causas de los altos niveles de H.G.H. en los pacientes cirróticos.

SRIVASTAVA y cols. (110) estudiando el tiempo medio de desaparición de H.G.H. marcada en doce enfermos cirróticos encontraron que éste se hallaba aumentado (31,8 minutos frente a 18,7 minutos del grupo utilizado como control); no obstante también existió una ostensible diferencia entre

"espacios de distribución" (M. en cirróticos 106 ml/kg., controles 80 ml./kg), y así pues, la "tasa aclaramiento metabólico", mostró una diferencia mucho menos marcada -- (cirróticos 2,13 ml./minuto, normales 3,13 ml./minuto), explicándose pues la divergencia entre $t_{1/2}$ y "aclaramiento metabólico" por el aumentado espacio de difusión en los cirróticos.

Aunque todo ello pudiera hablar en parte de una cierta acumulación o mantenimiento de las cifras de H.G.H. obtenidas tras el estímulo, las cifras basales, así como la respuesta anómala ante la glucosa no deben estar influenciadas por ello.

Tampoco el posible "stress", parece deba influir sobre estos dos puntos, ya que los sujetos controles fueron sometidos a las mismas pruebas en las mismas condiciones.

FRANTZ y RABKINS (111), han mostrado que los estrógenos, estimulan la secreción de H.G.H. Conocido es, que signos clínicos como son: ginecomastia, arañas vasculares, eritema palmar tan frecuente en pacientes cirróticos, han sido interpretados, como un predominio de estrógenos en dichos enfermos, y esta opinión parece apoyada en hallazgos como los de SHAVER y cols. (112), que encontraron, una disminución del aclaramiento hepático de estrógenos en un grupo de estos pacientes. Así es posible pensar, que este fuera uno de los mecanismos, que influencia el comportamiento observado de la H.G.H.

Sin embargo, consideramos muy interesante, los trabajos de PIMSTONE y cols. (106) que estudiando los niveles de H.G.H. en pacientes con malnutriciones crónicas y niños con KWASHIORKOR, pudieron encontrar en los mismos cifras basales altas, y un comportamiento anómalo ante la sobrecarga de glucosa, semejante a lo obtenido por nosotros en nuestros cirróticos.

Los pacientes de PIMSTONE pres^oentaban una correlación - negativa entre proteínas totales y albuminas y niveles de H. G.H., y datos similares hemos encontrado en nuestro grupo cirróticos, Fig. 18 y 19. Ello no es de extrañar, ya que en dicho tipo de enfermos, el hábito nutricional, así como una - síntesis proteica disminuida por alteración del metabolismo proteico a nivel hepático, condicionaría un estado semejante, aunque no tan intenso al de los pacientes señalados.

Los hallazgos antes mencionados, impulsaron a KERNOFF y PIMSTONE (113) a estudiar el posible papel de la H.G.H. sobre la síntesis y catabolismo de las albúminas en las ratas, y pudieron observar como ambos procesos aumentaban en presencia de dicha hormona, aunque predominando el primero.

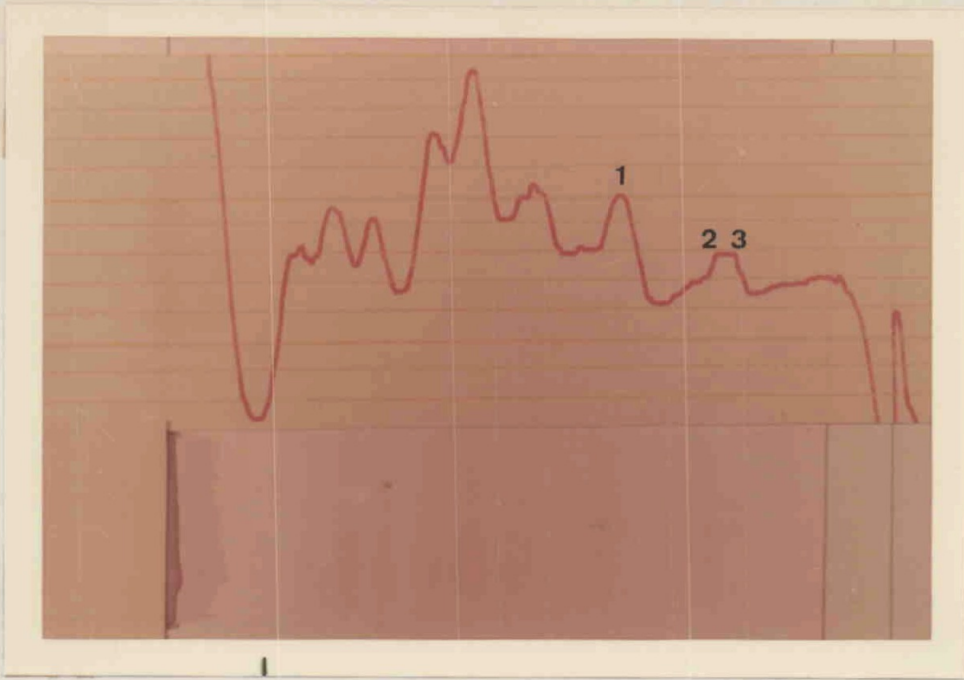
Así pues, no sería ilógico pensar tras estos hallazgos, que la secreción de la hormona de crecimiento se influenciara en sentido positivo, por los niveles, bien plasmáticos o intracelulares de determinadas proteínas, estableciéndose pues un auténtico sistema de "feed-back".

En esta misma línea de pensamiento, los autores antes mencionados, estudiaron si existía relación en sus pacientes entre H.G.H. y distintos aminoácidos en plasma, encontrando - una correlación negativa significativa entre valina, leucina e isoleucina del grupo de aminoácidos esenciales y una correlación positiva entre dicha hormona e histidina. (PIMSTONE(114).

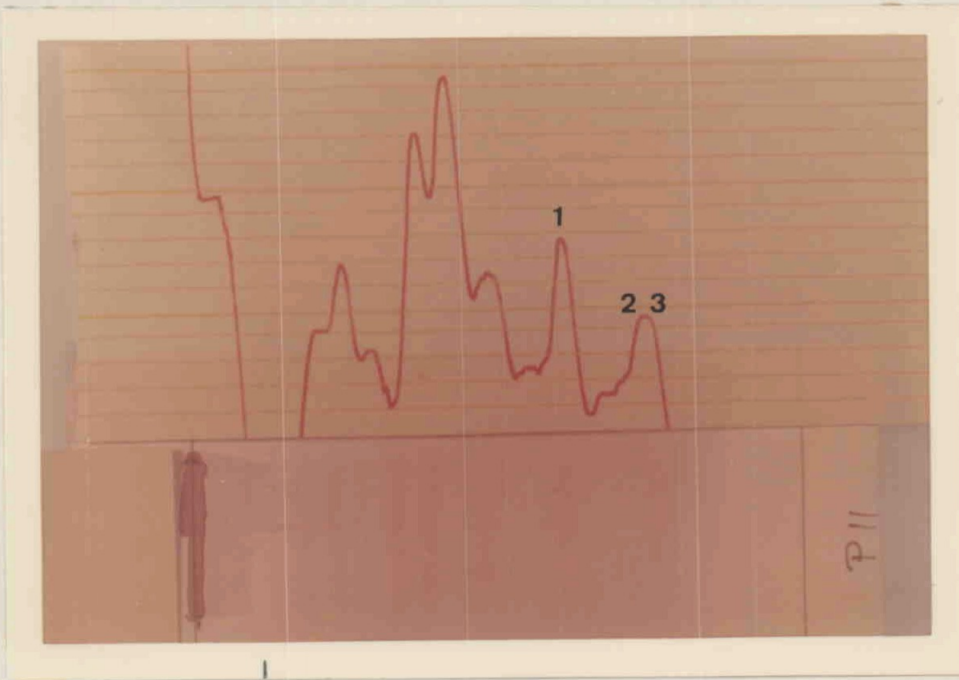
El estudio cualitativo de dichos aminoácidos, en los plasmas correspondientes a las basales de las pruebas intravenosas de nuestros cirróticos aparece en la figura 21, contrastando por su menor cuantía, con el realizado en tres sujetos normales fig. 22.

Aunque somos conscientes de la necesidad de obtención - de otros parámetros tales como: tasa catabólica y anabólica - de albúmina, y determinación cuantitativa de aminoácidos, los datos obtenidos en nuestros pacientes nos permiten al menos

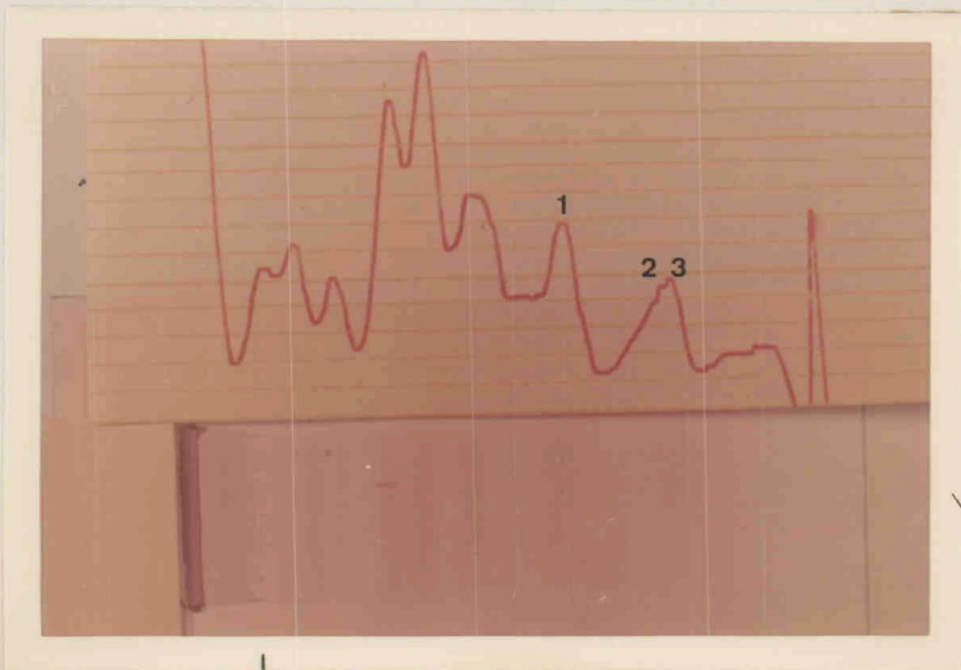
1 - VALINA



2 - LEUCINA

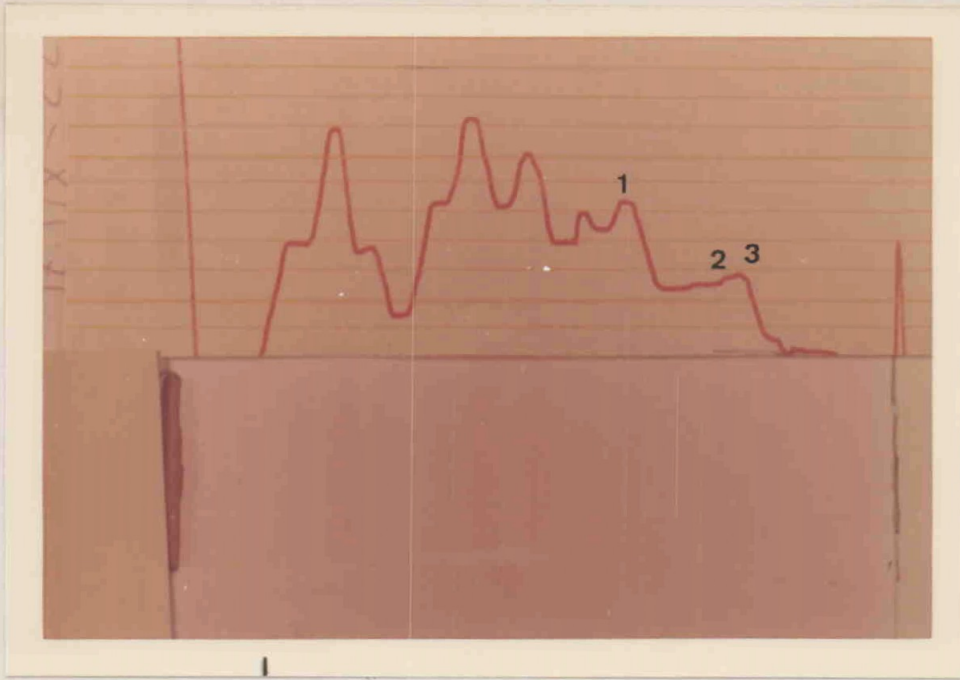


3 - ISOLEUCINA

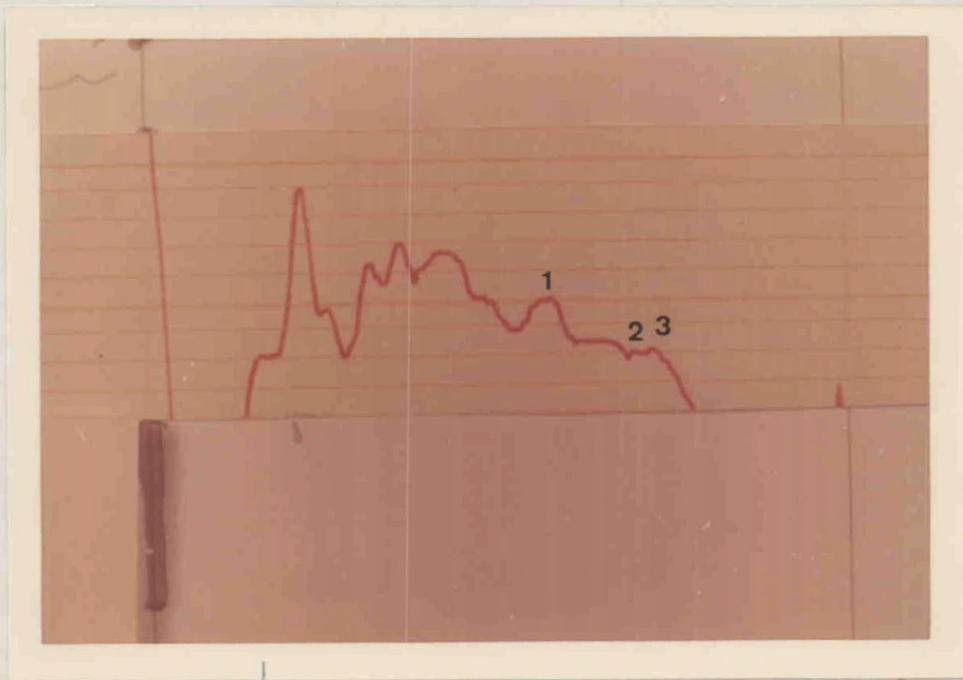


N
O
R
M
A
L
E
S

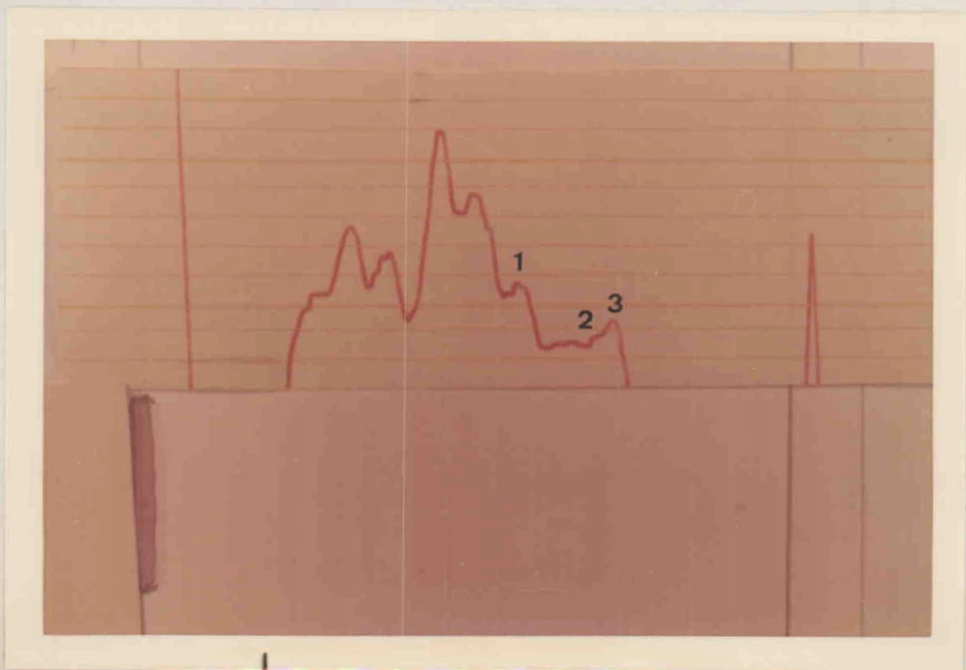
1 - VALINA



2 - LEUCINA

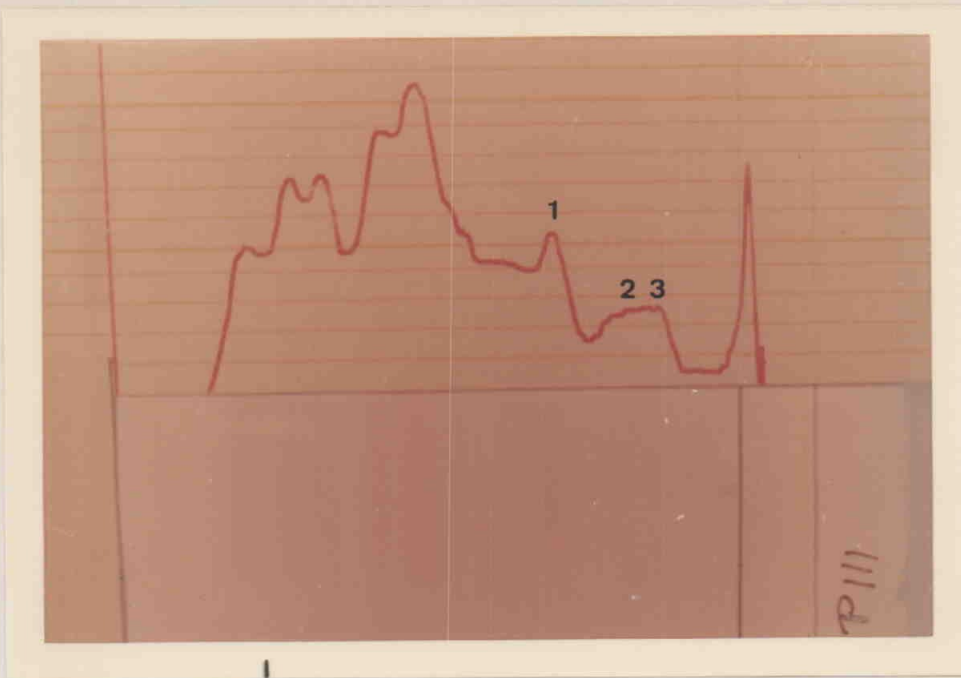


3 - ISOLEUCINA

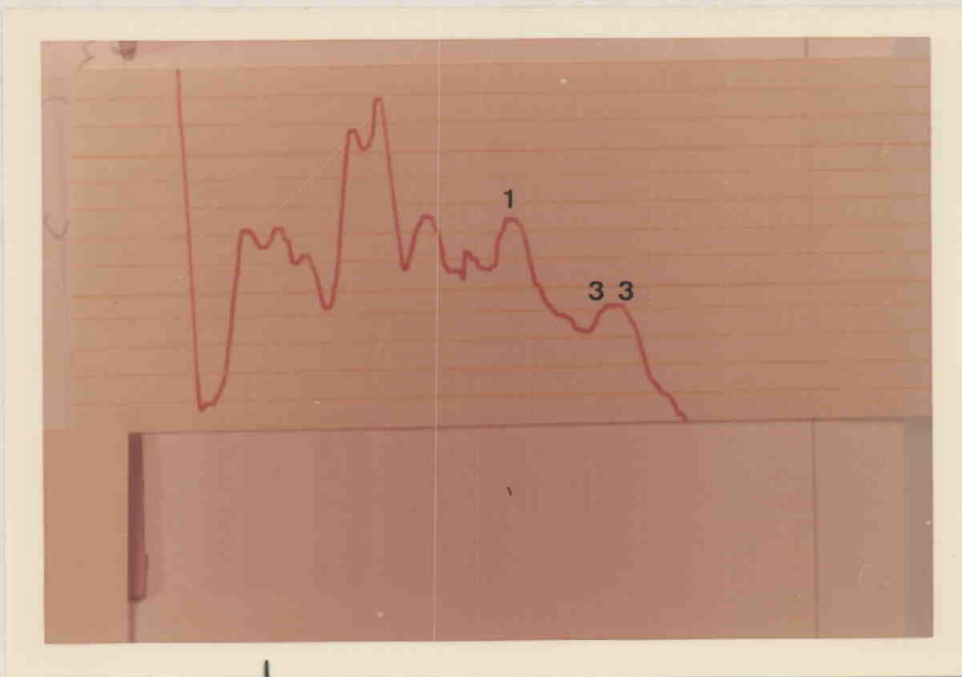


C
I
R
R
O
T
I
C
O
S

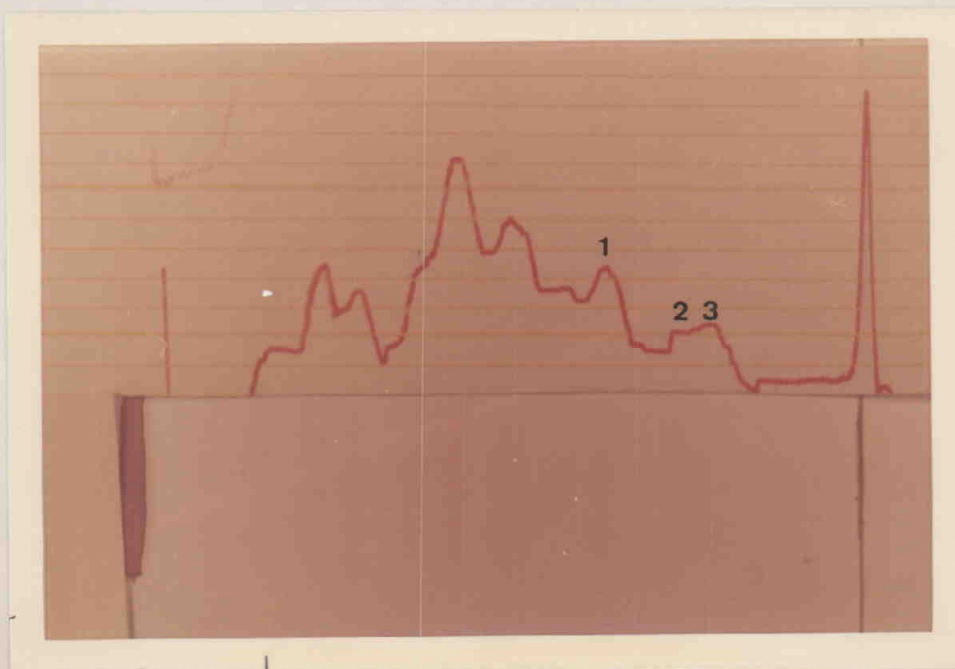
1-VALINA



2-LEUCINA



3-ISOLEUCINA



C
I
R
R
O
T
I
C
O
S

pensar, si no será la deficiencia del metabolismo proteico a cualquiera de sus niveles, de aminoacidos esenciales o proteínas, la que a través de un aumento de la secreción de hormona de crecimiento, condicionaría una resistencia a la insulina endógena, forzando al pancreas a segregar más insulina y si este no tuviera tal capacidad, o por causas sobreañadidas claudicase, aparecería la insuficiencia asimilativa hidrocarbonada.

C A P I T U L O V

Conclusiones.

CONCLUSIONES

1º) El grupo estudiado, Cirróticos sin antecedentes personales ni familiares de diabetes, y en avanzado estado evolutivo, mostró un alto porcentaje (79%) de intolerancia hidrocabonada -- tras ambas sobrecargas de glucosa, oral e intravenosa.

2º) Las cifras de Insulinemia obtenidas en el grupo de Cirroticos con tolerancia de hidrocabonada normal, tanto absoluta, como relativas, resultantes de la aplicación del índice insulínico de SELZER, ofrecen un patrón de hiperinsulinemia plasmática ante el estímulo oral e intravenoso.

El grupo de Cirróticos con intolerancia hidrocabonada mostró hipoinsulinemia relativa al estímulo tras sobrecarga oral y normoinsulinemia tras sobrecarga intravenosa, pudiendo ello ser reflejo del fallo de los estímulos gastrointestinales actuantes sobre la liberación de insulina pancreática.

3º) La comparación de las cifras de glucemia tras estimulación, entre los grupos de Cirróticos con intolerancia hidrocabonada y diabéticos de Madurez no ofreció significatividad estadística entre las diferencias. En cambio, las cifras de insulinemia muchas más elevadas en el grupo de cirróticos con intolerancia hidrocabonada a los 30' 60' 90' ($P < 0,05, 0,01, 0,01$)

4º) Los niveles de Proinsulina o (Proinsulin "like") plasmáticos, así como los porcentajes de proinsulina sobre insulina inmunorreactiva encontrados, nos permiten descartar ^{ello} sea la causa de la disminuida eficacia biológica de la Insulina en nuestros pacientes portadores de Cirrosis Hepática, ya que las diferencias objetivadas, con significatividad estadística, entre el grupo de pacientes cirróticos con tolerancia hidrocabonada normal y sujetos normales controles: mayor nivel de

Proinsulina (ng/ml) a los 90', y porcentaje de Proinsulina - disminuido a los 30'; en los primeros se explica:

- a) Por una mayor secreción paralela de Insulina, pues al comparar luego los porcentajes obtenidos para - dicho punto las diferencias entre ambos grupos carecieron de significatividad estadística.
- b) Dicho hallazgo señala incluso una mayor proporción de Insulina en el grupo Cirrótico.

5º) Así pues, la discordancia entre las cifras insulinémicas halladas, sin estar aumentados los niveles de Proinsulina -- plasmática, y la asimilación hidrocarbonada, nos permite establecer un estado de resistencia a la insulina endógena liberada en los pacientes estudiados.

6º) El comportamiento dinámico del Cortisol, analizado a través de las cifras plasmáticas obtenidas tras la sobrecarga de glucosa, no parece debe influir en dicha insulinoresistencia, ya que en los pacientes Cirróticos con intolerancia hidrocarbonada los valores basales disminuyen a lo largo de la prueba, mientras que se elevan a partir de los 40' en los Cirróticos - con tolerancia hidrocarbonada normal, comportamiento idéntico, este último, al de los sujetos normales estudiados.

7º) En cambio, la gran elevación paradójica de los niveles de Hormona de Crecimiento ante ambos tipos de sobrecargas de Glucosa en completo contraste con la anulación que esto sufre en los sujetos normales, sugiere que el comportamiento dinámico - de la citada hormona juega un importante papel en la insulinoresistencia antes señalada, que preside el metabolismo hidrocarbonado del grupo de pacientes cirróticos objeto de nuestro trabajo.

8º) Las correlaciones negativas encontradas entre proteínas totales plasmáticas, albúmina, y HGH, así como los niveles --- disminuidos de algunos aminoácidos ramificados esenciales Vali

na, Leucina e Isoleucina, dado el importante papel desarrollado por dicha hormona sobre la síntesis proteica, nos permite apuntar la posibilidad de la influencia de las deficiencias del metabolismo proteico, como estímulo de la liberación paradógica de HGH en los pacientes cirróticos.

9a) El grupo de pacientes cirróticos estudiados se caracteriza pues por niveles insulínicos poco efectivos, los valores de Proinsulina plasmática no justifican dicha ineficacia, la hormona de Crecimiento con un comportamiento dinámico anómalo se destaca como importante factor patogenético de la mencionada insulinoresistencia.

C A P I T U L O V I

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

- 1) SOSKIN S.; ALLWEISS M.D. y COHN D.J.,
"Influence of pancreas and liver upon dextrose tolerance curve."
Am.J.Physiol - 109 - 155 - 1.934.
- 2) SOSKIN S.; ESSEX H.E.; HERRICK J.F. y MANN F.C.
"Mechanism of regulation of blood sugar by the liver"
Am. J. Physiol - 124 - 558 - 1938.
- 3) LEVINE R. y HAFT D.E.
"Carbohydrate homeostasis"
New England J. Med. - 283 - 175 - 1970
- 4) CAHILL C.E. OWEN O.E.
"Some observations on carbohydrate metabolism in man. Carbohydrate metabolism and its Disorders".
Vol. 1, pag. 49 - Ed. F. DIKENS, JIP RANDLE, W.J. WHELAN.
Academic Press. London 1968.
- 5) SHOEMAKER W.C., YANOF H.M. , TURK L.N.
"Glucosa and fructose absorption in the unanesthetized dog"
Gastroenterology -44 - 654- 1.963
- 6) EXTON H.H. y PARK C.R.
"The role of cyclic AMP in the control of liver metabolism"
Advances Enzyn Regulat, -6- 39 - 1968
- 7) JEANRENAUD B.
"Adipose tissue dynamica and regulation, regisited"
Ergebn, physiol, 60 - 57 - 1.968.
- 8) SEIGE K
"Uber hepatitis bey diabetes mellitus"
Mataria Medica Nordmark - 11 - 1 - 1.959.
- 9) SEIGE K.; THIERBACH V.
"Posthepatitische shäden be diabetes mellitus"
LXV Congr. Verh Dtschen Ges. Inn Mediz - 1.959
- 10) JESON W.K.
"Joslin's Diabetes mellitus"
Lea & Febiger p: 711 - 1.971
- 11) SELTZER H.S.
"Insulin secretion in response to Glycemic Stimulus:Relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes Mellitus".
J.Clin. Invest. 46: 323 - 335 - 1967

- 12) PERLEY M.; KIPNIS.
 "Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose.
 Studies in normal and diabetic subjects".
 J. Clin, Invest. 46- 1954 - 1957
- 13) ROTH J.; GORDEN P. PASTAN I.
 "Big" insulin: a new component of plasma insulin in man"
 J. C lin, Invest. 47- 84 9 1968.
- 14) RUBENSTEIN A.H. ; CHO S.;STEINER D.F.
 "Evidence for proinsulin in human urine and serum"
 Lancet - 1 - 1353 - 1.968
- 15) CHANCE R.E.;ELLIS R.M.; BROMER W.W.
 "Porcine proinsulin: characterization and aminoacid sequence"
 Science - 161 - 165 - 1.968.
- 16) STEINER D.F.;OYER P.E.
 "The Biosynthesis of insulin and a probable precursor of
 insulin by a human islet cell adenoma.
 Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.- 57 - 473 - 1.967.
- 17) STEINER D.F.; CLARK J.L. ;MOLAN C.;RUBENSTEIN A.H.; MARGO+
 LIASH E.; ATEN B. ; OYER P.E.
 "Proinsulin and the biosynthesis of insulin"
 Recent Progress in Hormone Research.
 E.B. Astwood (Ed) Academic Press - 25: 207 - 1.969.
- 18) SHAW W.N.; CHANCE R.E.
 "Effect of porcine proinsulin in vitro on adipose tissue
 and diaphragm of normal rat".
 Diabetes - 17 - 737 - 1.968
- 20) KITABCHI A.E.
 "The biological and immunological of pork and beef insulin,
 and connecting peptides".
 J.Cli. Invest . 49 - 979 - 1.970.
- 20) GOLDSMITH J.S.; YALOW S.R.; BERSON A.S.
 "Significance of human plasma insulin sephadex fractions".
 Diabetes - 18- 834 - 1.969.
- 21) MELANI F. ; RUBENSTEIN A.H. STEINER D.F.
 "Human serum proinsulin".
 J.Clin, Invest. 49 - 497 - 1.970.
- 22)HOUSSAY, B.A.; BIASOTTI, A.; RIELTI C.T.
 "Action Diabetogene de L'extrait antehypophysaire"
 C.R.Soc. Biol . 111- 479 - 1932

- 23.- KETTERER B.; RANDLE P.J.; YOUNG F.G.
 "The pituitary growth hormone and metabolic processes"
 Ergebn Physiol - 49 - 127 - 1.957.
- 24.- YOUNG E.G.
 "Outstanding unanswered questions concerning experimen-
 tal diabetes".
 B.S. Leibel & Wrenshall (Ed.)
 Excerpta Medica Foundation - p: 736 - 1.965
- 25.- HAIST R.E.; CAMPBELL J.; BEST C.H.
 "The prevention of diabetes".
 New. Eng. J. Med. 223 p 607 - 1940
- 26.- VARGAS L.
 "Effect of human growth hormone on insulin production in
 panhypopituitarism".
 Lancet - 2 - 1395 - 1964.
- 27.- RANDLE P.J.; YOUNG E.G.
 "The mechanism of the influence of pituitary growth hormo-
 ne on metabolism".
 Hormonal Regulation of Energy Metabolism. p= 91 - 1.957
- 28.- IKKOS, D.; LUFT R.
 "Aspects of the metabolic action of human growth hormone"
 CIBA Foundation colloquia on Endocrinology
 Human Pituitary Hormones - 13- 106 - 1960.
- 29.- RABEN M.S.; HOLLENBERG C.H.
 "Growth hormone and the mobilization of fatty acids"
 CIBA Foundation Colloquia on Endocrinology.
 Human Pituitary Hormone - 13 - 89 - 1960.
- 30.- WEIL R.
 "Pituitary growth hormone and intermediary metabolism"
 Acta Endocr. 49 Suppl 98 - 1 - 1965.
- 31.- YOUNG F.G.
 "Pancreatic hormones: Insulin"
 Comparative Endocrinology.
 New York Academic Press. p: 371 - 1963
- 32.- FAIN H.N.; KOVACEV V.P.; SCOW R.O.
 Effect of growth hormone and Dexamethasone on lipolysis
 and metabolism in isolated fat cells of the rat".
 J. Biol. Chem. - 240 - 3522 - 1965.
- 33.- RANDLE P.J.
 "The glucose fatty acid cycle".
 On the Nature and treatment of Diabetes
 Excerpta Medica Foundation p: 361 - 1965.

- 34.- SCHONFELD G.; KIPNIS
 "Glucose-Fatty- Acid interrelations in the rat diaphragm in vivo".
 Diabetes 17 - 422 - 1968.
- 35.- RABINOWITZ D.; KLASSEN G.A. ; ZIERLER K.
 "Effect of human growth hormone on muscle and adipose tissue metabolism in the forearm of man".
 J. Clin. Invest, 44 - 51 - 1965.
- 36.- GLICK S.M. ; ROTH J.; YALOW R.S.; BERSON
 "Immunoassay of human growth hormone in plasma"
 Nature 199 - 784 - 1963.
- 37.- ROTH J.; GLICK S.M. ; YALOW R.S.; BERSON S.A.
 "Hypoglycemia: a potent stimulus to secretion of growth hormone"
 Scicen 140 - 987 - 1963
- 38.- ROTH J.; GLICK S.M.; YALOW R.S.; BERSON S.A.
 "Secretion of human growth hormone: Physiologic and experimental modification".
 Metabolism 12 - 577 - 1963.
- 39.- ENGEL F.L.
 "Extra-adrenal actions of adrenocorticotropin"
 Vitamins hormones 19- 189 - 1961
- 40.- HO R.J.; MENG H.C.
 "The extraoortical action of adrenocorticotrophic hormone of the elevation of plasma free fatty acids".
 Metabolism 13 - 361 - 1964.
- 41.- LEBOVITZ H.E. ; BRYANT K.; FROHMAN L.A.
 "Acute effects of corticotropin and related peptides on carbohydrate and lipid metabolism"
 Annl N.Y. Acad. Sci. 131 - 274 - 1965.
- 42.- KLINE D. ; ESTRICH D.
 "Plasma insulin concentration in Cushing's syndrome and thyrotoxicosis".
 Clin, Res. 12 - 354 - 1964
- 43.- LONG C.N.H.; KATZIN R.; FRY E.G.
 "The adrenal cortex and carbohydrate metabolism".
 Endocrinology 26 - 309 - 1940.
- 44.- WAGLE S.R.
 "Studies on mechanism of gluconeogenesis in diabetes"
 Biochem. Biophys. Acta 97 - 142 - 1965.

- 45.- WAGLE S.R.
"Studies on mechanism of glucose synthesis in diabetic and normal rat liver".
Diabetes 15 - 19- 1966.
- 46.- INGLE D.J.
"The production of glycosuria in the normal rat by means of 17 -Hydroxi- 11 - Dehydrocorticosterone".
Endocrinology 29 - 649 - 1941.
- 47.- INGLE D.J.; THORNG G.W.
"A comparison of the effects of 11- Deoxycorticosterone acetate and 17-Hydroxi-11-Dehidro-corticoserone in partially depancreatized rats".
Amer. J. Physiol. 132 p 670 - 1941
- 48.- JEANRENAUD B.; RENOLD A.E.
"Metabolic effects of corticoids".
Handbuch des Diabetes Mellitus. Munich.
Vol: 1, p. 591.
- 49.- WILLIAMSON J.R.,; KREBS H.A.
"Acetoacetate as fuel of respiration in the perfused rat heart"
Biochem. J. 80 - 540 - 1961.
- 50.-SHIPP J.C. ; RUSSELL R.O.; STEINKE J.; MITCHALL M.L.;HADLEY W.B.
"Insulin resistance with high levels of circulating insulin like. Activity demonstrable in vitro and in vivo".
Diabetes 10 - 1 - 1961
- 51.- FELTS P.W. ;CROFFORD O.B. ;PARCK C.R.
"Effect of infused ketone bodies on glucose utilization in the dog".
J. Clin. Invest. 43 - 638 - 1964.
- 52.- MEBANE D.; MADISON L.L.
"Hypoglycemia action of ketones I. Effects of ketones in hepatic glucose output and peripheral glucose utilization"
J. Lab. Clin, Med. 63 - 177 - 1964.
- 53.- GELBER J.P.; VANNOTTI A.
"Effect of fat infusion on glucose tolerance and insulin plasma levels".
Med. Exp. (Basel) 10 - 153 - 1964.
- 54.- SCHALDH D.S.; KIPNIS D.M.
"Abnormalities in carbohydrate tolerance associated with elevated plasma non esterified fatty acids".
J. Clin. Invest. 44 - 2010 - 1965.

- 55.- HALES C.N.; RANDLE P.J.
 "Effect of low-carbohydrate diet and diabetes mellitus on plasma concentrations of glucose, non esterified fatty acids and insulin during oral glucosa tolerance test".
 Lancet 1 - 790 - 1963.
- 56.- RANDLE P.J. ; GARLAND P.B.; HALES C.N.; NEWSHOLME E.A.
 "The glucosa fatty acids cycle. Inst.rele insulin sensivity and the metabolism diatur ances of diabetes mellitus".
 Lancet 1- 785 - 1963.
- 57.- WALLANCE - OWEN J.; LUKENS F.D.
 "Studie on insulin antagonism in plasma".
 Encocrinology 60 - 625 - 1957.
- 58.- WALLANCE-OWEN J.
 "Synalbumin antagonism in obesitu and maturity-onset diabetes mellitus".
 Ann. N.Y. Acad. Sci. 131 - 315 - 1965.
- 59.- WALLANCE-OWEN J.
 "Insulin antagonist"
 On the Nature and treatment of Diabetes. Amsterdam.
 Excerpta Medica Foundation p: 340 - 1965.
- 60.- ANTONIADES H.N.; HUBER A.M. ; GRESHO F.S.
 "Bound" Insulin: in vivo and in vitro biologi activity"
 Diabetologia 1 - 195 - 1965.
- 61.- ANTONIADES H.N.; BOUGAS J.A.; CAMERINI DAVALOS R.; PYLE H.M.
 "Insulin regulatory mechanism and diabetes mellitus"
 Diabetes 13 - 230 - 1964.
- 62.- RUBENSTEIN A.H.; MELANI F.; PILKIS S.; STEINER D.F.
 "Proinsulin. Secretion, metabolism immunological and biological properties".
 Postgrad. Med. J. (Suppl) 45 - 476 - 1969.
- 63.- BRUSH J.
 "Purification and ad characterization of a new protease with specifity for insulin rat muscle".
 Diabetes 20 - 140 - 1970.
- 64.- KITABCHI A.E.; DUCKWORT W.C.; BRUSH J.S.; HEINEMAN M.
 "Direct measurement of Proinsulin in human plasma by the use of an insulin-degradingenzyme.
 J.Clin., Invest. 50 - 1792 - 1971

- 65.- KOBBERLING S.G.; CREUTFELDT W.
 "Comparison of different methods for the evaluation of the oral glucose tolerance test".
 Diabetes 19, no 11: 870 - 877. 1970.
- 66.- O, SULLIVAN J.B.; SNYDER P.J.; SPORER A.C.; DANCHO R:W.;
 "Intravenous glucose tolerance test and its modification by pregnancy".
 J. Clin. Endocr. 31 - 33 - 37 - 1970
- 67.- HUGGET A.; NIXON D.A.
 "Use of glucose oxidase, peroxidase, and O-Dianisidine in determination of blood and urinary glucose".
 Lancet ii: 368 - 1957.
- 68.- BERSON S.A.; YALOW R.S.
 "Immunoassay of protein hormones"
 The Hormones Vol 4: 557 - 630 .- 1964.
- 69.- HALES C.N. ; RANDLE P.J.
 "Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate"
 Biochem. J.88 - 137 - 1963.
- 70.- MOLINATTI G.M.; MASSARA F.; STRUMIA E.; PENNISI F.; SCASSE+
 LLATI G. A.; VANCHERI L.
 "Radioimmunoassay of human growth hormone".
 J. Nucl. Biol. Med. 13 - 26 - 1969
- 71.- MURPHY B.E.P.
 "Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay".
 J. Clin. Endocri. 27 - 973 - 1967.
- 72.- KEILIND D.; HARTREE E.F.
 In "Methods in Enzymology"
 Vol. 1, B.P. Colowick and N.O. Kaplan, Editors. New York: Academic Press, p: 454 - 1957.
- 73.- MAGYESI C.; SAMOLS E.; MARKS V.
 "Glucose tolerance and diabetes, in chronic liver disease"
 Lancet 2: 1151 -1967.
- 74.- SCHREIBER W.M.; CONN H.O.
 "Glucose tolerance in cirrhosis of the liver":
 Ann. Intern. Med. 66: 1032 -1967.
- 75.- FELDER J.P.; MAGNENAT P.; VANNOTTI A.
 "Tolerance au glucose diminuée et réponse insulínique élevée dans la cirrhosis".
 Schweiz Med. Weschr 97: 1537 - 1539 - 1967.

- 76.- CONN H.O.; SCHREIBER W.; ELKINGTON S. G.
 "Association of impaired glucose tolerance with Portal-systemic shunting in Laennec's cirrhosis".
 Digestive Diseases, vol: 16 - 227 - 1971.
- 77.- COLLINS J.R.; CROFFORD O.B.
 Glucose intolerance and Insulin Resistance in Patients With Disease ,
 Archiv. of Inter. Medic. 124: 142 - 148, 1969.
- 78.- MADISON L.L.
 Physiological significance of the secretion of endogenous Insulin Into the Portal Circulation: V. the Quantitative Importance of the Liver In the Disposition of Glucose Loads.
 Diabetes 12: 8 - 15, 1963.
- 79.- BONDY P.K.; JAMES D.F.; FARRA V.W.
 Studies of the Liver in Human Carbohydrate Metabolism by the Venous Catheter technic: I Normal Subjects Under Fasting Conditions and Following the Injection of Glucose.
 J. Clin. Invest, 28: 238 - 244, 1949.
- 80.- ACERAD E.
 Etude de la Glycoregulation et de L'insulinemia avant et apres Anastomosa Portacave.
 Diabetes 15: 50 - 56, 1967.
- 81.- SAGILD V.; ANDERSEN V.; ANDREASEN P.B.
 Glucose Tolerance and Insulin Responsiveness in Experimental Potassium Depletion.
 Act. Med. Scand 169: 243 - 251, 1967.
- 82.- CON J.W.
 Hypertension, the Potassium Ion and Impaired Carbohydrate Tolerance.
 New. Eng. J. Med. 273: 1.135 - 1.142 , 1965.
- 83.- COLLINS J.R.; LACY W.W.; ATIEL J.N.; CROFFORD D.B.
 Glucose Intolerance and Insulin Resistance in Patients with Liver Disease.
 Archi . of Intern. Medic. 126, 608 - 614 - 1970.
- 84.- BUTTERFIELD W.E.H.
 Summary of Results of the Bedford Diabetes Survey
 Proc Roy Soc. Med. 57: 196 - 202, 1964.
- 85.- SAMAN N.A.; STONE D.B.; ECKHARDT R.D.
 Serum Glucose, Insulin, and Growth Hormone in Chronic Hepatic Cirrhosis.
 Archives of Internal Medicine 124: 149 - 152, 1969.

- 86.- TOMIZAWA H.H.
Degradation of Insulin
Williams R.N. Diabetes New - York:
Haper & Row. Publishers, Inc. 283 - 291, 1960.
- 87 .-TOMAS/T., SLEDZ D.; WALES J.K.
Insulin Half Life in Normal and Diabetic Subjets.
Proc. Soc. Exp. Biol, Med. 126: 315 - 317, 1967.
- 88.- McINTYRE,N.; HOLDSWORTH C.D.; and TURNER D.S.
Intestinal Factors in the Control of insulin secretion
J. Clin., Endocr. 25: 1.317 - 1.324, 1965.
- 89.- PETERS N.
Exocrine and Endocrine Pancreatic Function in Diabetes -
Mellitus and Chronic Pancreatitis.
Gut 7: 277 - 281, 1966.
- 90.- STEINER D.F.
Proinsulin and the Biosynthesis of insulin.
New Eng. J. Med. 280: 1.106 - 1.113.
- 91.- GORDEN P.; ROTH J.
Circulating Insulins.: "Big" and "Little".
Archiv. Intern. Med. 123: 237 - 247 , 1969.
- 92.- LACY P.E.
Ultrastuctural changes of the beta cell
during insulin secretion. II Capri conference on the
"Mechanism and regulation of insulin secretion".
Acta Diabetol. Latina 5 (Suppl.I) 436- 1969.
- 93.- HED.R.
Clinical Studies in Chronic Alcoholism.J. Incidence of
Diabetes Mellitus in Portal Cirrhosis.
Acta Méd. Scand. 162: 189, 1958.
- 94.- BODEN G.,SOELONER J.S.;STEINKE J., and THORN G.W.
Serum Human Growth Hormone (H.G.H.) Response to I.V. Glu-
cose.
Diagnosis of Acromegal Metabolism 17: 1, 1968.
- 95.- CREUTZFELDT W.
Klinische Beziehugen Zwischen Diabetes Mellitus und Leber
Acta Hepato-esplenol 6: 156, 1959.
- 96.- BECK P., SCHALCH D.S.; PARKER M.L.; KIPNIS D.M.; DAUGHADAY
W.H.
Correlative studies of Growth Hqrmone and Insulin Plasma
Concentrations With Metabolic Abnormalities in Acromegaly.
J.Lab. Clin, Med. 66: 366, 1965.

- 97.- KARAN J.H.; GRODSKY G.M.; PAULATOS F.C. and FORSHAM P.H.
Critical Factors in Excessive Serum-insulin Response to
Glucose Obesity in maturity onset Diabetes and Growth
Hormone in Acromegaly.
Lancet 1: 286, 1965.
- 98.- LUFT R. and CERASI E.
Effect of Human Growth hormone on insulin production in
Panhypopituitarism.
Lancet 2: 124, 1964.
- 99.- KIPNIS D.M.; and STEIN M.F.
Insulin Antagonism
Fundamental considerations Ciba Foundation Colloquia on
Endocrinology 15 : 145, 1964.
- 100.- HERNANDEZ A., ZORRILLA E., GERSHBERG H.
Decreased insulin Production, Elevated Growth Hormone Le-
vels, and Glucose Intolerance in Liver Disease.
J.Lab. Med. 73; 25, 1969.
- 101.- CONN H.N.; DAUGHADAY W.H.
Cirrhosis and Diabetes V. Serum Human Growth Hormone
Levels in Laennec's Cirrhosis.
J.Lab. Clin. Med. 76: 678 - 687, 1970
- 102.- ROTH J.; GLICK S.M.; YALOW R.S.; BERSON S.A.
Secretion of Human Growth Hormone.
Physiologic and Experimental modification. Metabolism
12: 577, 1963.
- 103.- BECK P.; PARKER M.L. , and DAUGHADAY W.H.
Paradoxical Hypersecretion of Growth Hormone in response
to Glucose.
J. Clin. Endocr. 26: 423, 1966.
- 104.- PELROTH M.G.; TSHUDY D.P. , WAXMAN A., ODELL W.
Abnormalities of Growth Hormone
Regulation in Acute intermittent Porphyria.
Metabolism 16: 87, 1967.
- 105.- SAMAN N.; PEARSON O.H.; GONZALEZ D. LLERENA O.
Paradoxical Secretion of Growth Hormone in Patients With
Breast Cancer.
J. Lab. Clin. Med. 68: 1011, 1966.
- 106.- PIMSTONE B.L.
Growth Hormone and Protein Calorie Malnutrition
Lancet 2: 1333 - 1334, 1967.

- 107.- ZIELER K.L., RABINOWITZ D.
Roles of Insulin and Growth Hormone Based on Studies of Forearm Metabolism in Man.
Medicine (Balt) 42: 385 - 402, 1963.
- 108.- BRONK M.S.; FISHER R.B.
The Interaction of Growth Hormone and Insulin in the Perfused Rat Heart,
J. Physiol 136: 435 - 447, 1957.
- 109.- BERSON S.A.
Nobel Symposium 13 Almqvist & Wikell Stockholm 302 - 304-1970.
- 110.- SRIVASTAVA M.C.; TOMPKINS C.V.; SONKSEN P.H.; NABARRO J.N.
Diabetologia 6: 648, 1970.
- 111.- FRANTZ A.G.; RARKIN M.T.
Effects of Estrogen and sex Differences on Secretion of Human Growth Hormone.
J. Clin. Endocri. 25: 1470, 1965.
- 112.- SHAWER J.C.; ROGINSKY M.S.; CHRISTY N.P.
Clearance from Plasma of Isotopically Labelled Oestradiol in Patients. With Hepatic Cirrhosis.
Lancet 2: 335, 1963.
- 113.- KERNOFF L.M.; PIMSTONE B.L.; SOLOMON J.; BROCK J.F.
The Effect of Hypophysectomy and Growth Hormone Replacement on Albumin Synthesis and Catabolism in the rat.
Biochem J. 124: 529 - 535, 1971
- 114.- PIMSTONE B.L.; SAUNDERS S.J., HANSEN J.D.L., BUCHAMAN LEE B.
In Protein and Polypeptide Hormones.
M. Margoulies ed. Excerpta Medica Foundation III. I.C.S. 161, 906, 1969.