

R. 9. 197



T.D.
M/37

UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTAD DE MEDICINA, CATEDRA DE
PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS II

"Niveles circulantes de SOMATOMEDINA B
en la insuficiencia hepática crónica"

Manuel Malagón Cobos

Sevilla, Marzo 1978



ANTONIO AZNAR REIG, CATEDRATICO NUMERARIO DE PATOLOGIA
Y CLINICA MEDICAS II, DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNI--
VERSIDAD DE SEVILLA.

C E R T I F I C A: Que la presente TESIS DOCTORAL titulada: "*Niveles circu-*
lantes de Somatomedina B en la insuficiencia hepática cróni-
ca", ha sido realizada integramente en mi Departamento por -
D. MANUEL MALAGON COBOS, bajo mi dirección y la del Dr. D. -
EMILIO HERRERA JUSTINIANO.

Se presenta esta Tesis Doctoral para aspirar al grado-
de Doctor, con mi aprobación.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla a diez
de marzo de mil novecientos setenta y ocho.



Prof. A. AZNAR REIG

Dr. E. HERRERA JUSTINIANO

A mi mujer y mi hijo.

A todos los intelectuales que trabajan
con entusiasmo sin perseguir la gloria
y aún vibran de emoción ante el descu-
brimiento.

" No hay cuestiones agotadas, sino hom-
bres agotados en las cuestiones"
(CAJAL)

" El conocimiento y la ciencia de las -
cosas se producen cuando hemos logra-
do penetrar en sus principios, sus --
causas y sus elementos. No juzgamos -
hallarnos en posesión mental de una -
cosa hasta no haber alcanzado sus --
principios primeros, sus causas prime-
ras y aún sus elementos primarios"
(ARISTOTELES: Física)

Deseo dejar patente mi más sincera gratitud:

- Al Prof. A. Aznar Reig, por el estímulo y apoyo prestados.
- Al Dr. E. Herrera Justiniano, verdadero motor y catalizador de este trabajo, que me inculcó la disciplina en la labor de investigación.
- A la Dra. M. Díaz Gálvez que, de la forma más desinteresada, aportó una valiosísima ayuda y dirección en la metódica de trabajo, con sacrificio de su tiempo.
- Al Dr. A. Aznar Martín, gracias al cual se pudo ampliar la casuística de enfermos para el estudio basal.
- Al Dr. A. Ma Sendón Pérez, por su eficaz colaboración en el desarrollo del trabajo. Su identidad de objetivos en cuanto a línea de trabajo nos acercó en lo profesional y en lo personal.
- A Gloria Clavijo Santos y Cristina Kanellou, A.T.S. del laboratorio de Exploración Funcional en nuestro Servicio, que no escatimaron su esfuerzo personal para la realización de las pruebas dinámicas en los enfermos. La pulcritud de su trabajo nos fué fundamental para la correcta recogida de muestras plasmáticas.

- A Silvia Salazar Navarrete, Mercedes Navarro López, Ma Angeles Romero de la Osa Romero y Ma Dolores Barbero Roldán, Auxiliares del Laboratorio del Servicio de Endocrinología, que pusieron algo de empeño personal y especial celo en la realización de su labor.
- A los Dres. C. Holgado, J. Ma Rubio, R. Ruibérriz y C. López Guilarte, que nos facilitaron gran parte de los enfermos cirróticos estudiados.

I N D I C E

Páginas

- INTRODUCCION	1
- OBJETIVOS	32
- MATERIAL Y METODOS.	36
- RESULTADOS	49
- EPICRITICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.	58
- CONCLUSIONES.	87
- BIBLIOGRAFIA.	93

I N T R O D U C C I O N

Uno de los descubrimientos clásicos en el campo de la endocrinología fué el conocimiento de la participación que la glándula pituitaria juega sobre la promoción del crecimiento.

Ya quedan relativamente lejos las experiencias de EVANS y LONG (1921), en las cuales provocaban gigantismo en ratas normales mediante inyecciones intraperitoneales repetidas de extractos crudos procedentes de lóbulo anterior de hipófisis de vacas (1).

En 1930, SMITH, P.E. demostró que la hipofisectomía en la rata joven produce enanismo e infantilismo y que ello se puede restaurar mediante la inyección de extractos crudos hipofisarios (2).

El crecimiento esquelético es el resultado de la acción recíproca de:

- a) Factores genéticos.
- b) Atmósfera bioquímica de nutrientes e iones en el fluido extracelular.
- c) Reguladores hormonales específicos del crecimiento celular.

En esta introducción, que no pretende ser un estudio exhaustivo de los factores de crecimiento, nos ceñiremos sólo a los factores hormonales y, más específicamente, a aquéllos que de alguna manera se relacionan con la hormona de crecimiento, aunque resulte inevitable hacer algunas otras consideraciones más o menos tangenciales.

El papel de la hipófisis sobre el crecimiento ha sido reiteradamente comprobado desde los primeros ensayos ya mencionados. El paso siguiente que se intentó en el conocimiento de estos hechos fué aislar la sustancia o sustancias responsables y tratar de dilucidar sus implicaciones metabólicas.

De la ingente cantidad de datos recogidos en la literatura puede ser escogido, por representativo a este respecto, el hallazgo por LI y EVANS en 1949 de que el tratamiento crónico de ratas adultas con hormona de crecimiento purificada provocaba un incremento en el contenido proteico del animal. Asimismo, se demostró que disminuía la excreción de nitrógeno urinario en los perros tratados con GH y, consiguientemente, que retenían nitrógeno y que el efecto primario de la hormona de crecimiento in vivo era estimular la captación de aminoácidos y su incorporación a las proteínas tisulares (RUSSEL, 1955). (3)

Es bien conocido que los cartílagos de conjunción de los huesos largos disminuyen su grosor con la hipofisectomía y -

que vuelven a crecer con la administración de GH. Este fenómeno -- fué empleado en ensayos biológicos como medida indirecta de la GH (GESCHWIND y LI, 1955). (4)

Comoquiera que la incorporación de sulfato ($SO_4^{=}$) -- marcado al cartílago como condroitín sulfato es un índice fiel -- del metabolismo cartilaginoso y casi todo el sulfato incorporado lo hace como mucopolisacáridos, la medida de esta incorporación -- se utilizó más tarde como índice de actividad metabólica en este tejido.

HERBAI en 1970 (5) observó como la incorporación de sulfato in vivo al cartílago costal de ratones disminuía en un 30% -- después de la hipofisectomía.

Entre tanto, la hormona de crecimiento procedente de la pituitaria de algunos animales y del hombre, ha sido purificada y conocida su estructura química. Mediante el uso de tales preparaciones ha sido bien establecido que la hormona de crecimiento in vivo promueve el crecimiento esquelético y la síntesis proteica. Hoy se conoce que la hGH es una cadena única polipeptídica de 191 aminoácidos con dos puentes disulfuro internos. A pesar del error inicial en la secuencia de aminoácidos, la hormona de crecimiento primitivamente sintetizada por LI y YAMASHIRO mostraba una acción biológica de alrededor del 10% con respecto a la hormona nativa.

(6) Esto indicaba que la estructura primaria completa no es nece-

saria para la expresión de una cierta actividad biológica.

Posteriores experiencias llevadas a cabo mediante fragmentación de la hormona han revelado que determinados fragmentos tienen actividad insulín-like bajo ciertas condiciones experimentales mientras que en otras puede actuar como antagonista de la insulina.

Tras una digestión parcial con tripsina SONENBERG, KIKUTANI, FREE, NADLER y DELLACHA, han conseguido aislar dos componentes homogéneos, uno de P.M. 16.000 designado A-I y otro de P.M. 5.000 conocido como A-II. Este último produce un incremento significativo en el peso corporal y en el grosor del cartilago epifisario cuando es inyectado a la rata hipofisectomizada; el fragmento A-I tiene menos actividad y ninguno de los dos es, desde luego, tan potente como la hormona nativa. (7). Sólo el fragmento A-II es activo in vitro estimulando la captación de glucosa y su oxidación a CO_2 , la incorporación de glucosa a glicérol, liberación del glicérol y la incorporación de histidina a proteína (SWISLOCKI, SONENBERG y YAMASAKI, 1970) (8). Sin embargo, ha sido comprobado por NIALL, HOGAN, TREGGAR, SEGRE, HWANG y FRIESEN (1973) que un péptido sintético correspondiente a la estructura propuesta para el fragmento A-II no tiene efecto biológico (9).

Todos estos estudios con fragmentos de la hormona han mostrado que las distintas funciones metabólicas deben ser desempeñadas por diferentes regiones de la molécula. La región que con mayor probabilidad posee actividad promotora del crecimiento parece estar comprendida en la secuencia 80-140.

El mecanismo mediante el cual logra su efecto biológico final ha sido un tema profusamente estudiado y discutido (ENGEL y KOSTYO, 1964; KORNER, 1970; KOSTYO, 1968) (10), (11), (12), sin embargo, hasta el momento es sólo parcialmente conocido.

El año 1957 es una fecha relevante en este campo por lo que significa de apertura de un nuevo horizonte. En efecto, en este año SALMON y DAUGHADAY observaron que la adición in vitro de hormona de crecimiento al cartílago de rata no reproducía los efectos de la inyección al animal. Por otra parte, comprobaron que el suero de rata normal era capaz de estimular in vitro la captación de sulfato en el cartílago de rata hipofisectomizada, mientras que el suero de rata hipofisectomizada carecía de este efecto(13). Estos hallazgos llevaron a los citados autores a postular la acción indirecta ejercida por la hormona de crecimiento sobre el cartílago, sugiriéndose la existencia en plasma de un factor GH-dependiente que entonces se denominó "Factor de Sulfatación".

Este fenómeno ha sido ampliamente confirmado. Antes de 1962 muchos laboratorios adoptaron el ensayo biológico del fac--

tor de sulfatación (SF) para evaluar el estado funcional de la glándula hipofisaria. De éste modo se encontró que la actividad del SF está incrementada en los pacientes acromegálicos, mientras que en el hipopituitarismo con retraso de crecimiento ocurre lo contrario, hecho que se puede corregir mediante la administración de GH exógena (DAUGHADAY y ALEXANDER, 1958; ALMQVIST, IKKOS y LUFT, 1961) (14), (15).

Con el advenimiento del radioinmunoanálisis (RIA) para la hormona de crecimiento, el interés de los ensayos de actividad SF con fines de aplicación clínica decayó, pero en el terreno de la investigación se ha seguido trabajando sin pausa hasta hoy, lo cual ha permitido conocer que el factor de sulfatación tiene un alcance mucho más extenso en sus acciones que el señalado hasta ahora. Efectivamente, en estudios sobre cartilago de diferentes especies animales se ha visto que el suero que contiene SF estimula la incorporación de leucina a los mucopolisacáridos, uridina a RNA, timidina a DNA (SALMON y DU VALL, 1970) (16), y la conversión de prolina marcada a hidroxiprolina del colágeno (DAUGHADAY y MARIZ, 1962) (17). La máxima incorporación al cartilago de ratas hipofisectomizadas tiene lugar después de 2, 4, 12 y 18 horas, según que el substrato marcado sea leucina, uridina, sulfato y timidina, respectivamente (DAUGHADAY, 1971) (18).

Investigaciones paralelas en otros tejidos partiendo -

de SF parcialmente purificado, han demostrado que la acción biológica de éste factor no se halla limitada al cartilago. Por todo ello, y buscando una terminología más exacta, en 1972 se propuso abandonar el término "factor de sulfatación" y adoptar el de SOMATOMEDINA, seleccionado porque de este modo se indica la relación con la somatotropina (SOMATO) al mismo tiempo que su papel de intermediario o mediador de esta hormona (MEDINA). En ambos, "soma" hace referencia al tejido diana.

Después de haberse aceptado el término Somatomedina en lugar de Factor de Sulfatación, se comenzó a penetrar en su naturaleza química y biológica lo cual dió como fruto la separación de diversas fracciones dentro de lo que se llamaba "actividad de somatomedina". En efecto, la actividad de somatomedina en plasma va asociada a un complejo de alto peso molecular, somatomedina "grande" o, para designarlo en su forma más habitual dentro de nuestra terminología, "big"-SM, no dializable, sedimentable por ultracentrifugación y excluido por el Sephadex G-25. Otra "somatomedina" de menor peso molecular (SM "pequeña" o "small"-SM) puede ser extraída del plasma con el procedimiento utilizado anteriormente para la insulina, con etanol ácido; esto sugiere que la "small"-SM está fijada a una proteína plasmática en forma de "big"-SM. La evidencia directa de ésta unión proteica la han suministrado HINTZ, ORSINI y VAN CAMP, 1974, (19) entre otros. La

"small"-SM fué disociada de la "big"-SM mediante filtración en gel en ácido fórmico al 1%.

Basándose en la efectividad de extracción de "small"-SM del plasma humano esta técnica fué aplicada sobre grandes volúmenes de plasma caduco por los Laboratorios A.B. KABI (Estocolmo), con ulterior purificación y caracterización biológica por HALL, UTHNE, VAN WYK y sus colaboradores. Con técnicas convencionales tales como filtración en gel, absorción iónica cromatográfica y electroforesis, se logró obtener fracciones peptídicas altamente purificadas con pesos moleculares de 6.000 a 9.000. HALL y UTHNE verificaban su procedimiento de extracción mediante el bioensayo con cartílago costal de pollo. De este modo se llegó a aislar un péptido neutro que tenía una potencia biológica superior a un millón con respecto al plasma de partida.

Paralelamente y siguiendo los mismos primeros pasos -- que los requeridos en la purificación del péptido neutro con actividad somatomedina en cartílago siguiendo el método descrito -- por UTHNE, K. (1973), se aisló un segundo péptido biológicamente activo con carácter ligeramente ácido y sin acción sobre el cartílago pero que estimula la incorporación de timidina al fibroblasto y a la célula de la glia (20). De acuerdo con la sugerencia de UTHNE, K. (1973), la somatomedina responsable de la sulfa

tación del condroitín-sulfato se llamó Somatomedina A y la que estimula la síntesis de DNA en las células gliales, Somatomedina B.

Utilizando métodos muy similares para extracción de -- fracciones del plasma VAN WYK y cols. aislaron un péptido alcali no capaz también de estimular al cartilago de rata hipofisectomizada. Este péptido, que se ha llamado Somatomedina C ha sido hallado en el plasma humano y posteriormente en el de vaca y rata. (LIBERTI, 1975; CHOCHINOV, MARIZ y DAUGHADAY, 1976) (21) (22).

Los trabajos que hacen referencia a esta familia de somatomedinas, designadas por el momento por los sufijos A, B y C, que se han desglosado del más antiguo concepto de factor de sulfatación, son forzosamente muy recientes y necesitan algun tiempo antes de cristalizar y tomar cuerpo de doctrina en el terreno paradigmático. No obstante, estimamos imprescindible hacer una breve exposición de estos conocimientos actuales.

El aislamiento y caracterización de las sustancias promotoras del crecimiento ha seguido diversas etapas. Antes de que se planteara la reciente denominación de Somatomedina (SM), una de estas sustancias se desglosó y tomó personalidad propia. En efecto, en 1967, FROESCH, BURGI, MULLEN, HUMBEL, JAKOB y LABHART observaron que después de la adición de suero anti-insulina (AIS) al suero humano normal, un 90-95% de su potencia estaba presente aún (23). Por élllo se le aplicó el nombre de NSILA ("non-suppressible insulin-like activity").

FROESCH y su grupo en Zurich fueron los pioneros en el estudio de la caracterización, naturaleza química y propiedades biológicas de NSILA. Ellos han encontrado que la pancreatectomía no disminuye el contenido de NSILA y que los niveles son normales en los pacientes diabéticos. También han demostrado que la porción de ^NNSILA que es soluble en etanol ácido es un péptido de un peso molecular del alrededor de 7.500. Este péptido designado NSILA-S (non-suppressible insulin-like activity soluble en etanol ácido) es GH-dependiente, estimula la incorporación de sulfato en el cartílago de rata y compite con los receptores de insulina en fibroblastos de pollo. Varias proteínas de tamaño diferente con actividad insulin-like han sido purificadas del plasma humano; sin embargo, NSILA-S es la de mayor relación biológica con la somatomedina y forman una familia común (24).

MEGYESI, KAHN, ROTH, FROESCH, HUMBEL, ZAPF y NEVILLE - en 1974, usando una preparación de NSILA-S provista por FROESCH, demostraron que la membrana del hepatocito posee un receptor específico para NSILA-S que es distinto del receptor de insulina - (25).

En preparaciones altamente purificadas de NSILA-S se pueden separar dos péptidos de diferente secuencia de aminoácidos que han sido denominados NSILA S-I y NSILA S-II (ZAPF, FROESCH,

MORELL, HASELBACHER, RINDERKNECHT y HUMBEL, 1976; RINDERKNECHT y HUMBEL, 1976) (26) (27). La fracción de NSILA no extraíble con etanol ácido es una proteína de mayor peso molecular que se conoce con las siglas NSILA-P (non-suppressible insulin-like activity precipitated by acid ethanol). Es probable que se trata de un artefacto, consecuencia del tratamiento del suero con el etanol ácido y representa un 95% de NSILA total (sólo un 5% se separa como soluble). En resumen, las características de NSILA-S se pueden sintetizar así: Se trata de un péptido de P.M. 7.600 aislado mediante etanol ácido en la fracción III de Cohn del plasma humano mediante gel-filtración y afinidad cromatográfica. Su punto isoeléctrico es de 7,5-8,5. Es transportado en plasma por una proteína de alto peso molecular. Muestra actividad en los bioensayos con cartilago de rata y pollo pero no en cartilago de cerdo (FROESCH, ZAPF, MEULI, MADER, KAUFMANN y MORELL, 1975) (28). Estimula el crecimiento del fibroblasto e inhibe la actividad adenil ciclasa en varios tejidos (TELL, CUATRECASAS, VAN WYK y HINTZ, 1973) (29). Estimula, del mismo modo que la insulina, la captación de glucosa al interior del adipocito y de aminoácidos al músculo. Cuando se inyecta a ratas adrenalectomizadas induce una hipoglucemia prolongada que sobrepasa las 4 horas, en contraste con la insulina, cuya acción hipoglucemiante a igual dosis es mucho más fugaz, lo cual se atribuye a su más lenta degradación he

pática y a su efecto más duradero sobre el metabolismo del músculo. Los estudios de receptores han mostrado que éstos existen para NSILA-S en el tejido adiposo, hígado de rata, linfocitos humanos, fibroblastos de embrión de pollo y proteínas transportadoras específicas presentes en el suero humano. Su efecto como factor de crecimiento está probablemente mediatizado a través de su propio receptor y ningún efecto metabólico insulín-like está relacionado a la unión con el receptor de insulina. Por esta razón, aunque el NSILA-S presente en el suero es capaz de unirse al receptor de insulina, la cantidad que puede ser fijada es demasiado pequeña para tener consecuencias metabólicas. Estas consideraciones pueden explicar que los niveles plasmáticos de NSILA-S en pacientes diabéticos no controlados no puedan sustituir a la insulina. Digamos, por último, que su dependencia de la GH viene -- constatada por sus elevados niveles en plasma de sujetos acromegálicos, la disminución en casos de hipopituitarismo y su elevación tras la terapia con GH en enanos hipofisarios.

SOMATOMEDINA A

Tal vez sea la mejor conocida y estudiada hasta la fecha. Se trata de un péptido de un peso molecular 7.600 aislado a partir de la fracción IV de Cohn del plasma humano mediante ex--

tracción en etanol ácido y purificado por gel-filtración, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis de alto voltaje -- (20). Tiene un punto isoeléctrico a pH 7,1-7,5. Valiéndose de -- electroforesis en gel, FRYKLUND, UTHNE, Y SIEVERTSSON han conseguido distinguir dos subfracciones A_1 y A_2 (30), ambas con similar actividad en el bioensayo. La secuencia parcial de aminoácidos para las dos fracciones ha sido ya estudiada.

La somatomedina A es activa en los bioensayos sobre -- cartílago de rata, cerdo y pollo. Cuando UTHNE inyectó SM-A parcialmente purificada a ratas normales e hipofisectomizadas durante 5 días observó un incremento del 30% en el espesor de la tibia pero no hubo incremento del peso corporal.

La somatomedina A no sólo estimula la incorporación de sulfato al cartílago sino que tiene también una acción insulin-like en el tejido adiposo de la rata y en la fibra muscular del diafragma de ratas hipofisectomizadas.

Existen varios estudios que muestran la relación de dependencia con la hormona de crecimiento. Así, HALL y FILIPSSON -- en 1975, comunicaron su estudio de correlación entre actividad -- SM-A en suero y desarrollo del crecimiento corporal en niños sanos y en otros con alteraciones del crecimiento. La SM-A fue determinada siguiendo la técnica de incorporación de $^{35}\text{SO}_4$ al --

cartilago de embrión de pollo. La SM-A del suero problema fué -- comparada con la de una muestra arbitraria procedente de un "pool" de adultos sanos que sirvió de referencia. La Unidad de SM-A fué definida como la actividad biológica de 1 m^l de este suero. Los hallazgos del estudio fueron: altas correlaciones entre niveles de SM-A, edad y grado de madurez dental (ambas negativas) así como entre los niveles de somatomedina A y la tasa de crecimiento (positiva). Los amplios márgenes entre los enanos hipofisarios y los chicos de estatura poco común por altos, mostraron un gradiente continuo en la correlación entre actividad SM-A y las diferentes variables del desarrollo somático. También se encontró una correlación positiva con la respuesta de GH a la hipoglucemia in sulin-inducida (31).

Desde que se conoce la alta concentración de receptores para SM-A presentes en la membrana de la placenta, el análisis por radioreceptor es quizás el método de valoración más utilizado y más preciso. Desde 1974, HALL, TAKANO y FRYKLUND principalmente, vienen desarrollando éste método con el cual han aportado valiosos datos.

El primer paso en el mecanismo de acción de las hormonas polipeptídicas parece ser una interacción entre la hormona y su receptor específico en la membrana de los tejidos diana. Existe una buena correlación entre la capacidad de unión y la acción biológica de tales hormonas. Estos ensayos añaden la especifici-

dad biológica a la precisión del radioinmunoanálisis.

Los autores anteriormente citados, utilizando placenta humana demuestran que en altas concentraciones la insulina, interfiere con los lugares de fijación para SM-A y viceversa. En comparación con la insulina, la SM-A es un millón de veces más potente para desplazar la SM-A marcada con I-125 que para desplazar la insulina marcada de sus respectivos lugares de unión. Estos hallazgos indican que la SM-A debe tener otras funciones biológicas distintas a las de la insulina. Además, no sólo la insulina es capaz de competir con el receptor específico de SM-A. Mucho más eficaz en esta competencia se muestra la somatomedina C que, a bajas concentraciones es capaz de desplazarla.

El hecho de que sueros de pacientes acromegálicos sea seis veces más potente que el de pacientes con deficiencia de GH para desplazar la SM-A marcada indica, una vez más, que lo que se está midiendo tiene una estrecha relación con la hormona de crecimiento.

La comparación entre los resultados obtenidos mediante ensayo de receptores y el bioensayo sobre cartilago muestra algunas discrepancias. Así por ejemplo, la actividad por bioensayo sobre cartilago de pollo es el doble que midiendo el desplazamiento sobre receptores en placenta. La diferencia de actividad de -

SM-A entre pacientes acromegálicos y aquéllos con déficit de hormona de crecimiento fué mayor cuando se determinó por la técnica de desplazamiento de receptores que en el bioensayo para captación de sulfato. En el estudio efectuado por TAKANO, HALL, RITZEN, ISELIUS y SIEVERTSSON (1976) valorando SM-A en sujetos sanos y en diferentes estados patológicos y fisiológicos relacionados con el crecimiento, no encontraron correlación en los enfermos acromegálicos entre niveles de hGH y SM-A por análisis de radioreceptor (32). Para explicar estos hallazgos aparentemente contradictorios se han sugerido algunas explicaciones como éstas:

- Las proteínas presentes en el suero potencian el efecto de la SM-A en el análisis con radioreceptores.

- El suero contiene otros factores GH-dependientes distintos de la SM-A que compiten con élla en los lugares de fijación a la membrana pero no tienen acción sobre el cartilago.

- El suero contiene otros factores que inducen una inhibición en el bioensayo sobre cartilago (HALL, TAKANO, FRYKLUND, HOLMGREM y SIEVERTSSON, 1974-75) (33) (34). Sobre éste último punto se ha llamado la atención por diversos autores y se ha querido explicar su existencia en relación con el ayuno como un posible mecanismo regulador fisiológico para limitar o anular la actividad de la somatomedina en determinadas situaciones no cono

cidas aún (PHILLIPS y YOUNG, 1976; HERRERA JUSTINIANO, DIAZ GALVEZ, AZNAR MARTIN y AZNAR REIG, 1974). (35) (36)

Algunos datos valiosos sobre la naturaleza de éstos inhibidores han sido aportados recientemente por SALMON (1975) -- (37). Así, se sabe que tiene estructura proteica; que está presente tanto en el suero de la rata en ayuno de cuatro días como tras hipofisectomía y que el tratamiento del suero procedente de estos animales con tripsina aumenta claramente su actividad de somatomedina.

La extracción y purificación de SM puede eliminar la influencia de factores inhibidores. Tal procedimiento fué aplicado SALMON sobre un "pool" de suero procedente de ratas hipofisectomizadas y de ratas intactas tras cuatro días de ayuno. Los niveles de SM en el primer grupo fueron uniformemente bajos; en el segundo, claramente más altos; y en ambos, menor que la décima parte del valor encontrado en el suero de animales intactos bien alimentados (37).

Se supone un papel fisiológico para el inhibidor/es. Un incremento de inhibidor y un descenso de somatomedina son mecanismos complementarios para limitar los procesos anabólicos en condiciones de escasez de nutrientes. El papel beneficioso sería, pues, la conservación de substratos para los procesos vitales. Desde que DAUGHADAY y REEDER en 1966 encontraron que el suero --

procedente de ratas hipofisectomizadas aminoraba la incorporación de timidina, parece aceptarse la posibilidad de que el inhibidor module el control general del metabolismo cartilaginoso por la somatomedina (38).

La acción insulín-like de la SM también sugiere la posibilidad de que este inhibidor afecte a otros tejidos y esté emparentado con reconocidos antagonistas de la insulina.

SOMATOMEDINA C

Se trata, como ya apuntamos, de un péptido de P.M. -- 7.600 purificado también a partir de la fracción IV de Cohn del plasma humano mediante técnicas similares utilizando etanol ácido. Su punto isoeléctrico es de 8,4-9,2 y su secuencia de aminoácidos aún no se conoce. Se han encontrado receptores para este factor en la membrana del hepatocito de rata, cartilago de em- -- brión de pollo y diversos tejidos humanos (placenta, hígado, ri- -- ñón, pulmón, cerebro, músculo y timo), donde también es capaz de desplazar a la insulina (VAN WYK, UNDERWOOD, BASEMAN, HINTZ, CLEM MONS y MARSHALL, 1975) (39). Las diferencias en la afinidad del receptor determina la respuesta biológica a la insulina y SM-C -- en los tejidos. A niveles fisiológicos, el principal efecto de --

la insulina es el control del metabolismo, en tanto que el de la SM-C es favorecer el crecimiento celular.

La demostración de que la SM-C marcada al receptor en la placenta está relativamente libre de competición por la insulina y otras hormonas en concentraciones fisiológicas indica que esta somatomedina tiene su receptor específico, aparte de que -- pueda unirse al de la insulina. Dada la exquisita sensibilidad y afinidad de la SM-C a su receptor en la placenta cabe suponer -- que el efecto insulin-like que pueda ejercer por acoplamiento a los receptores de insulina tenga un papel muy secundario. Por el contrario, la estimulación del crecimiento fetal es una atractiva posibilidad aún no demostrada. (MARSHALL, UNDERWOOD, VOINA, - FOUSHEE y VAN WYK, 1974) (40).

Diferencias significativas en los niveles de SM-C han sido encontradas en sujetos normales y afectos de acromegalia e hipotuitarismo, así como su incremento en éstos tras el trata- - miento sustitutivo con hormona de crecimiento.

El desarrollo del RIA ha sido retrasado por la escasa antigenicidad de los péptidos-somatomedinas. FURLANETTO, D'ERCOLE, UNDERWOOD y VAN WYK comunicaron en el Congreso Internacional de Endocrinología de 1976 el desarrollo de un radioinmunoanálisis para SM-C después de conseguir la producción de un potente -

anticuerpo en el conejo acoplando la SM-C a ovoalbúmina con glutaraldehído. La reactividad cruzada con la SM-A y NSILA-S es sólo de un 1 y 2%, respectivamente, lo cual indica diferencias antigénicas entre éstos péptidos. Este método abre nuevos caminos a la investigación en el moderno campo de los factores de crecimiento (41).

Algunos datos referentes a su catabolismo se conocen ya gracias a la reciente comunicación de D'ERCOLE, DECEDUE, FURLANETTO, UNDERWOOD y VAN WYK (1977), demostrando que el riñón de rata es un importante órgano de depuración y que tal degradación de SM-C se puede lograr por dos vías diferentes: una ligada a una sulfhidril-proteasa en la membrana y otra, mediatizada por una "insulin-glucagón-proteasa" en el citosol, que se muestra como más efectiva. En este sentido, la SM-C actúa como un competitivo inhibidor de la degradación de la insulina, lo cual es otro dato que va de acuerdo con una cierta similitud estructural entre insulina y SM-C (42).

Hasta tanto no se conozca en profundidad la estructura completa de estos péptidos y se comparen no se sabrá con certeza, pero a la luz de los conocimientos actuales no puede descartarse la posibilidad de que SM-A, SM-C y NSILA-S sean distintas formas, más o menos artefactadas por los métodos de obtención, procedentes de un solo péptido natural existente en el plasma. En efecto,

hay muchas similitudes entre la familia de somatomedina que hasta hoy se barajan. RINDERKNECHT y HUMBEL aportaron en 1976 un interesante estudio analítico de la estructura de NSILA e Insulina, encontrando que existe en la secuencia de aminoácidos entre NSILA-S I y la cadena B de la insulina humana un 47% de residuos que son idénticos. Esta sorprendente similitud les permite avanzar - la hipótesis de que ambos péptidos, NSILA y cadena B de la insulina, sean el producto de la evolución de un péptido común y proponen reemplazar el término NSILA por el más general de IGF (insulin-like growth factor) (27).

Sin embargo, la Somatomedina B parece tratarse de una sustancia totalmente diferente.

SOMATOMEDINA B

En 1973, UTHNE, en un intento de mejorar el proceso de purificación de somatomedina y analizar sus acciones biológicas, recoge las aportaciones de DAUGHADAY y REEDER, SALMON, DU VALL, etc. referentes a la estimulación de incorporación de timidina - al cartilago y observa por sus propios estudios de purificación que éste efecto no podía ser separado de aquel que confiere la - capacidad de estimular la incorporación de sulfato a condroitin-sulfato.

Es un hecho conocido que la adición de suero al medio que baña las células en cultivo es un requisito previo para el inicio y mantenimiento de la síntesis de ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos por PIERSON y TEMIN en 1972, indicaban que el factor/es del plasma bovino que estimula la síntesis de DNA, el crecimiento y la mitosis en los cultivos de fibroblastos de pollo, tenía un peso molecular aproximado de 6.000. Esto hizo sospechar a UTHNE la posibilidad de que la somatomedina pudiera también jugar un papel en la iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos en los cultivos de células serodependientes (43).

Con vistas a investigar la posible conexión entre GH y el factor plasmático estimulante de la síntesis de DNA, se llevaron a cabo estudios sobre la incorporación de timidina a células de la glia por suero procedente de ratas hipofisectomizadas y tratadas con hGH, demostrando que éste suero, en efecto, estimulaba la síntesis de DNA después de tres a cuatro horas del tratamiento y la vida media de este factor estimulante podía estimarse que era de dos a tres horas. Este estudio puso de manifiesto que el factor responsable de la estimulación de la síntesis de DNA en la célula de glia humana no era el mismo que el que estimulaba la síntesis de DNA y la incorporación de sulfato en el cartilago. Los dos factores extraídos del plasma humano no podían ser claramente separados por gel-cromatografía debido a las pe--

queñas diferencias de peso molecular pero sí fué posible separar los mediante electroforesis, atendiendo a su diferente punto iso eléctrico. A instancias de UTHNE, se diferenció esta sustancia - como SOMATOMEDINA B (20).

Los pasos iniciales en la purificación son comunes para ambas somatomedinas, A y B. Para su ulterior purificación, la fracción enriquecida de SM-B obtenida después de cromatografía - en Sephadex G-50 en ácido fórmico al 1% se somete a electroforesis de zona a pH 7,5. La actividad estimulante del crecimiento - se encuentra en la región ácida. Este material se vuelve a purificar por electroforesis de zona a pH 5. El desglosamiento electroforético del péptido reconocido como somatomedina B se puede separar en cuatro fracciones con diferente carga, muy similares entre sí y cuya diferencia de carga neta puede ser explicados -- por diversos grados de amidación.

En el bioensayo sobre células gliales, sólo los péptidos más catódicos (bandas 3 y 4), incrementan la síntesis de DNA, mientras que los cuatro péptidos muestran igual actividad en el ensayo utilizando fibroblastos de embrión de pollo (SIEVERTSSON, FRYKLUND, UTHNE, HALL y WESTERMARK) (44).

Tal vez la observación más importante del análisis de composición de aminoácidos sea el hecho de que ninguno de los dos

(SM-A y SM-B) pueden ser un fragmento de la hormona de crecimiento.

La SM-B no tiene efecto sobre cartilago y no se han encontrado receptores en las membranas de los tejidos estudiados (pulmón, riñón, cerebro, hígado, corazón, tejido graso, testículo, timo, bazo y páncreas) por TAKANO, HALL, FRYKLUND y SIEVERTSSON en 1976 (45). Sin embargo, estos estudios no se han hecho sobre células gliales o fibroblastos, donde la SM-B tiene actividad biológica.

En 1975, YALOW, HALL y LUFT desarrollaron un método para radioinmunoanálisis de SM-B gracias al cual se ha podido medir sus niveles en plasma y en orina (46) -con una pequeña variante del método- con lo que se abre la posibilidad de estudiar aspectos de su dinámica circulatoria y su catabolismo.

Así como la laboriosidad del ensayo biológico para SM-A se simplificó mucho con el advenimiento de los estudios de receptores de membrana, las posibilidades abiertas para SM-B con el RIA son inmensas. Las ventajas del RIA, a saber, su simplicidad, sensibilidad y especificidad, hace posible la investigación sobre la naturaleza de la SM-B en una variedad de procedimientos químicos y procesos fisiológicos muy difíciles de abordar con el sólo método disponible del bioensayo. Además, ambos se complementan

tan ya que no son equiparables. La actividad biológica encontrada sobre fibroblastos y células de la glia no se puede extrapolar a los niveles circulantes en tal o cual circunstancia. Hasta qué punto habrá una relación entre estos dos conceptos sólo se sabrá a la vista de estudios simultáneos comparando niveles circulantes y efectos biológicos, máxime cuando las más recientes investigaciones sobre somatomedina parecen admitir, no sólo la presencia de inhibidores a los que ya nos referimos, sino de otros factores de crecimiento de muy diferentes pesos moleculares, y tal vez independientes de la GH. Algunos de estos factores quizás no sean de naturaleza proteica, como señalan BALA, BLAKELEY y SMITH en 1976 (47). Debe tenerse en cuenta, además, que hasta que la estructura de un péptido no se conoce perfectamente y se prepara sintéticamente, no se puede asegurar de forma tajante que el efecto biológico que se atribuye al péptido "purificado" no sea debido a contaminantes menores.

La relación de dependencia de la SM-B con la hormona de crecimiento se ha establecido en base a los hallazgos de altos valores en el plasma de sujetos acromegálicos así como de valores inferiores a lo normal en enfermos con hipopituitarismo y en acromegálicos sometidos a tratamiento radical que iba seguido de una caída de hormona de crecimiento (48). Asimismo, se ha comprobado que el suero de la rata hipofisectomizada tenía escaso -

poder de estimular la incorporación de timidina a las células --
gliales al comparar con el suero de rata normal. Después del tra-
tamiento de los animales con hGH (0,25 mg/Kg de peso), la activi-
dad del suero era parcialmente recuperada entre cuatro y cinco --
horas tras la inyección (WASTESON, WESTERMARK y UTHNE) (49).

No se ha podido detectar inmunorreactividad cruzada en
el suero de animales no primates. La especificidad de especie es
similar a la del radioinmunoanálisis para la hGH, es decir, exis-
te reacción cruzada con la hormona de primate pero no para con --
las otras especies animales. Este tipo de especificidad de espe-
cie es único entre los antisueros de hormonas peptídicas y éllo
ha sugerido que la SM-B pudiera ser un fragmento de la hGH. Ade-
más, el peso molecular de la cadena A-II, producto del desdobra-
miento enzimático de la hormona de crecimiento con probada acti-
vidad biológica, es de 5.000, es decir, similar al de SM-B.

Esta cuestión de si la SM-B era, o no, un fragmento de
la hormona de crecimiento ha suscitado un vivo interés. Aparte --
del conocimiento actual referente a su estructura, otra eviden-
cia muy sugestiva que va en contra de tal posibilidad se despren-
de de la consideración de su relativa concentración en plasma.

En efecto, la concentración plasmática de SM-B es más de un mi-
llar de veces mayor que la de hGH y, aunque en menor cuantía, per-

siste en sujetos adultos carentes de hormona de crecimiento. Por consiguiente, si la somatomedina B fuese un producto de degradación de la hGH su vida media tendría que ser aproximadamente mil veces mayor para mantener su concentración plasmática (48). No hay estudios en este sentido para SM-B pero conocemos, gracias a los trabajos de ALMQVIST y FALKHEDEW en 1961, que la vida media de la actividad SM como "factor de sulfatación" en el hombre es aproximadamente de 12 horas (50), en tanto que la de hGH es de 20-30 minutos. Datos muy recientes aportados por COHEN y NISSLEY (1976) sobre la vida media de actividad somatomedina siguiendo un bioensayo que mide la incorporación de timidina tritiada en fibroblastos de embrión de pollo, indican que ésta vida media es GH-dependiente y sugiere que la proteína transportadora de la actividad SM, así como la misma SM, está bajo el control de la hormona de crecimiento (51).

La SM-B circula en plasma unida a una proteína de tamaño similar a la gammaglobulina pero con una movilidad electroforética correspondiente a la alfa-globulina. También ha sido determinada en orina por YALOW y cols (46) encontrando que el 85% se excreta en forma libre y el 15%, unida a proteína. No se ha determinado si la proteína de unión es la misma en plasma que en orina pero parece poco probable que la proteína transportadora plasmática pueda ser excretada en sujetos sin enfermedad renal -

(46).

El bioensayo en células gliales se usa como test para varios factores promotores del crecimiento, entre ellos la SM-B y el FGF ("Fibroblast Growth Factor") ya que ambos incrementan la síntesis de DNA en este tipo de células. Los trabajos llevados a cabo por WESTERMARK y WASTESON han demostrado que la mayor parte de la actividad promotora del crecimiento en los cultivos de células gliales es dependiente de las plaquetas. El factor de crecimiento in vivo parece existir como precursor inactivo, que puede ser activado cuando las plaquetas liberan su contenido en forma parecida al mecanismo de puesta en marcha del proceso de la coagulación de la sangre. El suero pobre en plaquetas aumenta su débil actividad biológica al añadirle concentrado de plaquetas o un lisado de ellas que, por si mismo también tiene poca actividad (52).

Para terminar esta introducción consideraremos, siquiera sea de forma somera, los conocimientos actuales sobre el lugar de síntesis y liberación de la Somatomedina, tema que ha despertado el interés de muchos investigadores en este campo.

Desde que se adoptó la hipótesis de que la SM era una sustancia formada en respuesta a la acción de la GH, de cuya

hormona sería el "efector biológico", se intentó identificar el tejido o tejidos donde se originaba cuantificando la actividad SM en diferentes tejidos, esperando tal vez, encontrar un almacenamiento allí donde tal generación tuviese lugar. Así, en 1971, SALMON, W.D. encuentra débil actividad SM en extractos de hígado, páncreas, riñón, bazo, glándulas salivares, corazón, timo, suprarrenal, hipófisis y tiroides. Es decir, ni la adenohipófisis ni otros órganos o glándulas contienen un incremento considerable en la concentración de tal actividad (53).

A pesar de la ausencia de esta evidencia de almacenamiento hay actualmente datos suficientes para imputar al hígado como el mayor responsable en este fenómeno. Este aserto viene apoyado por los siguientes datos experimentales:

a) La hepatectomía parcial de la rata provoca un rápido decremento en la actividad SM del suero. Posteriormente y de forma paralela a la regeneración hepática, la actividad SM se incrementa de nuevo, (UTHNE, K. y UTHNE, T., 1972) (54).

b) Una prueba más directa de la síntesis hepática la aportan los trabajos de McCONAGHEY y SLEDGE perfundiendo hígados aislados de rata, sin y con adición de GH, comprobando subsiguientemente la capacidad del líquido de perfusión para estimu-

lar la incorporación de sulfato en el cartilago de rata hipofisectomizada. El perfundido que contiene GH produce mucha mayor estimulación (55) (56).

DAUGHADAY, PHILLIPS y HERINGTON reprodujeron este experimento en su contenido básico pero comparando la capacidad de generación de SM con y sin GH en hígados procedentes de ratas, - unas hipofisectomizadas y otras intactas. La hipofisectomía previa no modifica la capacidad de producción de SM del hígado del animal al ser perfundido con GH exógena. (57). Estos mismos autores, junto a KARL, I.E., utilizando un sistema de perfusión contínua perfeccionado, determinaron el tiempo que tarda en desaparecer la SM endógena, tanto en hígados de ratas intactas como - hipofisectomizadas y aportaron el dato de que el hígado de rata hipofisectomizada y tratada con GH produce una actividad SM en el sistema de perfusión que es equiparable a la encontrada en - hígados de ratas no hipofisectomizadas (58).

c) Un péptido "Somatomedin-like" ha sido encontrado en - el seno de un tumor hepático de rata de una determinada estirpe celular (SMITH y TEMIN, 1974) (59).

d) Los sujetos con enfermedad hepática crónica muestran en su plasma menos actividad SM (valorado como factor de sulfa-

tación) que los individuos sanos (WU, GRANT, HAMBLEY y LEVI, -- 1974) (60).

e) Experimentos en el perro en condiciones más cercanas al estado fisiológico, han sido realizados por SCHIPFF, DONNA-- DIEU, GLASINOVIC, WARNET y GIRARD en 1976 valorando actividad -- de SM por incorporación de sulfato marcado al cartilago de em-- brión de pollo antes y después de la administración intramuscu-- lar de hormona de crecimiento durante 7 a 9 días. La diferencia de valores obtenidos entre las muestras sanguíneas procedentes de las venas hepáticas y portal relacionados al flujo hepático, indican una importante producción de somatomedina por parte del hígado (61).

Sin embargo, la producción de somatomedina no parece -- quedar limitada al hígado. Estudios preliminares de McCONAGHEY y DEHNEL en 1972 prueban que la perfusión de riñón de rata nor-- mal e hipofisectomizada con adición de GH puede generar activi-- dad "SM-like". Incluso en un medio que contiene cortes de riñón, la adición de GH provoca la aparición de actividad SM. Queda -- por saber si este factor es idéntico al obtenido del plasma(62).

En último término, el mecanismo por el cual la hormona de crecimiento induce la producción de somatomedina es completa-- mente desconocido.

OBJETIVOS

De los estudios realizados hasta el momento parece desprenderse, pues, una relación entre hígado y Somatomedina aunque no tenemos aún la prueba concluyente y é^llo se deriva, principalmente del hecho de no disponer de la suficiente cantidad de sustancia purificada como para emplearla directamente y estudiar su metabolismo, tanto in vivo como in vitro.

Esta relación entre hígado y somatomedina se revela especialmente clara en lo que se refiere a Somatomedina A, que ha sido la más extensamente estudiada.

Atraídos por el tema, y recogiendo los conocimientos actuales, hemos querido ver si, por su parte, la Somatomedina B, polipéptido de menor peso molecular que la SM-A y también en relación de dependencia con la hormona de crecimiento, estaría ligada de algún modo con el hígado. Observamos un vacío, en este sentido, en la literatura mundial consultada. En este estudio, el nexo o punto de referencia común de partida sería la dependencia de ambas somatomedinas, A y B, con la hormona de crecimiento.

Con la idea directriz de indagar esta posible relación entre órgano y hormona, nos propusimos estudiar:

A) Si los niveles medios circulantes de SM-B en la población de enfermos cirróticos era diferente de los encontrados entre los sujetos adultos sanos.

Caso de que lo fuese, estudiar si élllo guarda relación con:

10) ALTERACIONES HEPATICAS, como:

a) Afectación del parénquima noble, estudiado a través de:

- Síntesis de enzimas y proteínas normalmente mantenidas por el hígado, tales como:

- Albúmina

- Colinesterasa

- Factores de coagulación

• Fibrinógeno

• Tiempo de protrombina

- Sustancias eliminables por la bilis y patológicamente retenidas en la insuficiencia hepática:

- Fosfatasas alcalinas

- Bilirrubina sérica

- Depuración de otras sustancias que competen al hepatocito:

- Clearance de Rosa de Bengala I¹³¹

- Enzimas que reflejan citolisis o aumento de permeabilidad en la membrana del hepatocito, según la cuantía detectada. Se han elegido las transaminasas TGP y TGO, que son las corrientemente empleadas en la práctica clínica.

- Distintas fracciones del proteinograma, con especial interés en la gammaglobulina, como reflejo de la reacción inflamatoria hepática crónica.

b) Afectación de la circulación hepática, como dato característico del hígado cirrótico, estudiada indirectamente a través de la velocidad de aclaramiento de la sangre periférica de las partículas coloidales por las células del sistema reticulohistiocitario (S.R.H.) cuyo representante hepático es la célula de KUPFFER.

- Depuración de Oro coloidal

- Flujo sanguíneo circulante portal

20) ALTERACIONES HORMONALES directa o indirectamente inducidas por la hepatopatía crónica y relacionadas de alguna forma con actividades biológicas de otras somatomedinas:

- INSULINA

- ESTRADIOL

B) Estudiar en los pacientes en cuestión, una posible relación entre los niveles de hGH y los de Somatomedina B, punto de interés dado el comportamiento paradójico de aquélla en los pacientes afectos de insuficiencia hepática crónica. Como expresión del anómalo comportamiento de la hGH tomaríamos los niveles basales circulantes de la citada hormona, así como su respuesta claramente anormal ante un estímulo supresivo como es la sobrecarga oral de glucosa.

MATERIAL Y METODO

1) MATERIAL

A) Población estudiada

El desarrollo del presente estudio se ha llevado a cabo con los siguientes grupos de sujetos:

a) Controles

Un total de 33 sujetos adultos en edades comprendidas entre 18 y 65 años sin antecedentes de enfermedades hepáticas conocidas ni signos de afectación aguda o crónica en el momento del estudio y sin antecedentes alcohólicos. Tampoco existía enfermedad intercurrente de otra naturaleza ni signos de malnutrición.

b) Cirróticos

Se estudiaron 42 pacientes en régimen de internamiento hospitalario y no sometidos aún a tratamientos con diuréticos ni corticoides. El diagnóstico fué establecido por:

- Datos clínicos.- Se seleccionaron casos cuya anamnesis y exploración física eran claros para establecer el diagnóstico clínico de insuficiencia hepática.
- Datos bioquímicos.- Tales como pruebas funcionales hepáticas, transaminasas TGP y --TGO, proteínas totales y proteinograma, bilirrubina, colinesterasa, tiempo de pro- -trombina, fibrinógeno y fosfatasa alcalina.
- Exploración radioisotópica y morfológica - del hígado mediante gammagrafia. Esta ex--ploración fue realizada en 19 casos.
- En 26 casos el diagnóstico fué confirmado mediante laparoscopia y punción-biopsia.

B) Material utilizado

1) REACTIVOS

a) Hormonas

- "Standards"

- Somatomedina B purificada (A.B. KABI)
- Insulina humana (CEA-SORIN)

- Hormona de crecimiento humana (A.B. KABI)
- Estradiol (SIGMA)

- Hormonas marcadas

- Somatomedina B purificada (A.B. KABI) marcada en nuestro laboratorio con I^{125}
- Insulina porcina I^{125} (CEA-SORIN)
- Hormona de crecimiento (A.B. KABI) marcada en nuestro laboratorio con I^{125}
- 2,4,6,7 H^3 -Estradiol (AMERSHAN SEARLE)

- Anticuerpos (Ac)

- Ac anti-Somatomedina B (A.B. KABI)
- Ac anti-Insulina porcina (CEA-SORIN)
- Ac anti-hGH (A.B. KABI)
- Suero de conejo (DIFCO)
- Ac precipitante anti-suero de conejo (WELLCOME)
- Ac anti-Estrona 17-oxime (ENDOCRINE SCIENCES)

b) Tampones

- Buffer fosfato (PBS) pH 7 0,1 M
- Buffer fosfosalino pH 7,5 0,2 M

- Buffer fosfosalino pH 7,5 0,2 M con 0,1% de albúmina
- Buffer fosfosalino pH 7,5 0,2 M con 0,05% de albúmina
- Buffer borato pH 8 0,05 M
- Buffer fosfato pH 7,4 0,04 M con 4% de albúmina bovina.

c) Otros reactivos

- I^{125} (I.M.S. 30 AMERSHAN SEARLE)
- Seroalbúmina bovina (SCHWARZ/MANN)
- Suero humano normal standardizado por A.B. KABI para usar como patrón
- Carbon activado (SCHWARZ/MANN)
- Azida de sodio (MERCK)
- Sulfato amónico Ultra Pure (SCHWARZ/MANN)
- Lactoperoxidasa
- Agua oxigenada al 30% diluida al 1:10.000
- Líquido de centelleo PCSTM Solubilizer (AMERSHAN SEARLE)
- Sephadex G-25 (PHARMACIA)
- Sephadex G-50 "
- Sephadex G-75 "

- Sephadex LH-20 (PHARMACIA)
- Gammaglobulina bovina (SCHWARZ MANN)
- Eter dietílico (MERCK)
- Benceno (MALLINCKRODT) A.R.
- Metanol "
- Cloruro sódico
- IDRANAL (EDTA sódica) (RIEDEL)
- Hidróxido sódico (MERCK)
- Fosfato dihidrogenado de sodio (MERCK)

2) APARATOS UTILIZADOS

- Contador de centelleo para registro de radiación beta-débil L K B Wallac 1210 ULTROBETA
- Contador de radiación gamma de 2 canales (NUCLEAR CHICAGO)
- Centrifuga refrigerada DAMON/I.E.C. PR-6.000
- Cámara fría a 4°C
- Estufa de desecación
- Agitador electromagnético KOWELL
- Balanza de precisión METTLER tipo H-16 (Cap. 80 gr)

- Agitador Vórtex Atomixer
- pH-metro pH M-62 Radiometer (Copenhague)
- Campana de aspiración
- Pipeta automática Biopette con puntas desechables -
(SCHWARZ/MANN)
- Columna de vidrio de 10 x 100 mm.
- Columna de vidrio de 13 x 600 mm.
- Calculadora HEWLETT PACKARD 9815 A

2) METODO

A) Exploración de la población humana estudiada

a) Sobrecarga oral de glucosa

Después de una noche de ayuno y una vez en nuestro laboratorio de exploración funcional, a los pacientes se les insertó, a las 8 a.m., una cánula venosa (Butterfly) en la flexura del codo que se mantuvo mediante la infusión a ritmo muy lento de suero fisiológico. Tras media hora de reposo se tomó una muestra sanguínea basal e inmediatamente se les hizo ingerir 50 gr. de glucosa en 100 ml de agua fría, repitiendo la extracción a los 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 minutos, siempre en tubo heparinizado. La sangre se centrifugó tras cada extracción, se dividieron los plasmas en pequeñas fracciones alícuotas y se guardaron en congelador a -20°C para evitar la inactivación hormonal hasta posterior determinación de Somatomedina B, Insulina, hGH y Estradiol.

- b) A otros sujetos (cirróticos y normales) sólo les --
fué extraída la muestra basal en idénticas condiciones
experimentales.

B) Valoraciones analíticas y datos complementarios

a) No hormonales

- 1) Los datos analíticos correspondientes a transaminasas, bilirrubina, proteínas totales, proteinograma, colinesterasa y fosfatasa alcalina fueron realizados en el Laboratorio Central de Bioquimica del H.U.S. (Prof. Goberna). Se tomaron estos datos de la primera analítica solicitada tras el ingreso de los pacientes, antes de mediar el --
efecto de los diversos tratamientos instaurados y teniendo en cuenta que el método de determinación analítica expresará los resultados en las --
mismas condiciones y en el mismo tipo de unidades.
- 2) Los datos correspondientes a tiempo de protrombina y fibrinógeno se solicitaron y llevaron a cabo por el Servicio de Hematología del H.U.S. (Dr.

Pintado) y se tuvieron en cuenta los mismos factores.

- 3) La exploración isotópica funcional y gammagráfica hepática corrió a cargo del Servicio de Medicina Nuclear (Dr. Rodríguez de Quesada) según metodología descrita por BONILLA BLANES, F., BONILLA MIR, F. (pertenecientes al mismo Servicio) y AZNAR REIG, A. (106). Esta técnica utiliza como trazadores Rosa de Bengala I^{131} y Au 198 coloidal. Las curvas de aclaramiento se llevaron a cabo por detección externa con detector de centelleo de 2 pulgadas, debidamente colimado y situado sobre la región temporo-parietal izquierda del paciente. Primero se procedió a la inyección I.V. rápida de 40 microcurios de Rosa de Bengala I^{131} con registro subsiguiente de la curva de aclaramiento plasmático durante 14 minutos. A continuación se inyectaron 150 microcurios de Au 198 coloidal y se registró la curva correspondiente durante 25 minutos. Los T $1/2$ de aclaramiento normales por este método son de $3 \pm 0,3$ minutos para el Au 198 coloidal y de 9 ± 1 minutos para el Rosa de Bengala I^{131} . El cálculo de la eficacia depuradora

de la hepatona resulta del cociente entre el T 1/2 del Rosa de Bengala y el T 1/2 del oro coloidal. El volumen de sangre circulante hepático es obtenido en % a partir del cociente:

$$V.S.C. = \frac{T \ 1/2 \ Au^{198}}{77}$$

siendo 77 la capacidad específica de atrapamiento por parte del S.R.H. de las partículas coloidales, calculada anteriormente en una serie de sujetos normales.

Se consideran como valores normales:

Eficacia depuradora de la hepatona 33% \pm 2

Volumen de sangre circulante portal 30% \pm 2

- 4) Las exploraciones laparoscópicas se efectuaron en el Servicio de Endoscopia por los Drs Herre-rías y Osorio.
- 5) Finalmente, el estudio histopatológico de las -- piezas de biopsia es labor del Departamento de -- Anatomía Patológica (Prof. Galera Davidson).

b) Hormonales

1) Radioinmunoanálisis (RIA) para Insulina

Se ha seguido la técnica de HALES y RANDLE - -
(1963) (107)

2) RIA para hGH

Basado en la técnica descrita por MOLINATTI y
cols. (1969) (108).

3) Determinación de Estradiol

Según técnica radioinmunológica descrita en -
1971 por WU, C. y LUNDY, L. (109).

4) RIA de Somatomedina B

Para su realización hemos utilizado SM-B alta-
mente purificada, Anticuerpo anti-SM B y una -
preparación de suero humano normal (standard -
utilizado como patrón). Este material en su to-
talidad fué administrado por A.B. KABI.

El marcaje de la hormona lo realizamos median-
te el método de lactoperoxidasa, utilizando 0,5
mCi de I^{125} para 2 μ gr de proteína en 30 μ l de
buffer fosfato 0,1 M a pH 7. Tras la adición -

de 5 μ gr de lactoperoxidasa y agua oxigenada, la reacción se detiene en el transcurso de 50 segundos diluyendo la mezcla con 0,5 ml del mismo buffer de marcaje.

La purificación de la hormona marcada la realizamos mediante gelfiltración en Sephadex G-25 y G-75. En el primero separamos la hormona marcada del yodo libre empleando una microcolumna de 10 x 100 mm. En los perfiles de elución obtenidos aparece un gran pico en los primeros 3 ó 4 ml, que corresponde a la hormona marcada, saliendo a continuación el yodo libre.

Para separar la hormona marcada íntegra de aquella parcialmente destruida, se realizó una segunda purificación mediante Sephadex G-75 en columna de 13 x 600 mm. El perfil de elución obtenido muestra dos picos bien definidos, el segundo de los cuales corresponde a la fracción de hormona marcada menos dañada. La somatomedina B marcada se degrada fácilmente.

La actividad específica de la hormona marcada obtenida osciló entre 50 y 65 mCi/ μ g. Con la dilución del anticuerpo utilizada depositamos en tubo entre 40 y 60 μ g. de hormona marcada, que corresponde a unas 10.000 c.p.m. Ello

permite un rango de curva standard que va de 30 a 1.000 pg; teniendo en cuenta los niveles de SM-B circulantes, se requiere una dilución de la muestra plasmática entre 1:10.000 y 1:20.000. La dilución se realiza en buffer con 0,05 % B.S.A.

A la concentración del anticuerpo usada se requieren de 3 a 4 días para alcanzar el equilibrio de reacción.

Para la separación de las fracciones libre y ligada empleamos carbón activado en una suspensión de 50 mg/ml (5 mg. por tubo). Los blancos bajos con hormona recién purificada indican, con su progresivo aumento, la necesidad de una repurificación.

C) Análisis matemático de los datos obtenidos

Las valoraciones analíticas obtenidas se sometieron a estudio estadístico con ayuda de una calculadora HEWLETT PACKARD 9815 A, obteniendo media, desviación standard, error standard, t pareada e impareada, grado de correlación, ecuación de regresión y significatividad de P por el test de Student.

RESULTADOS

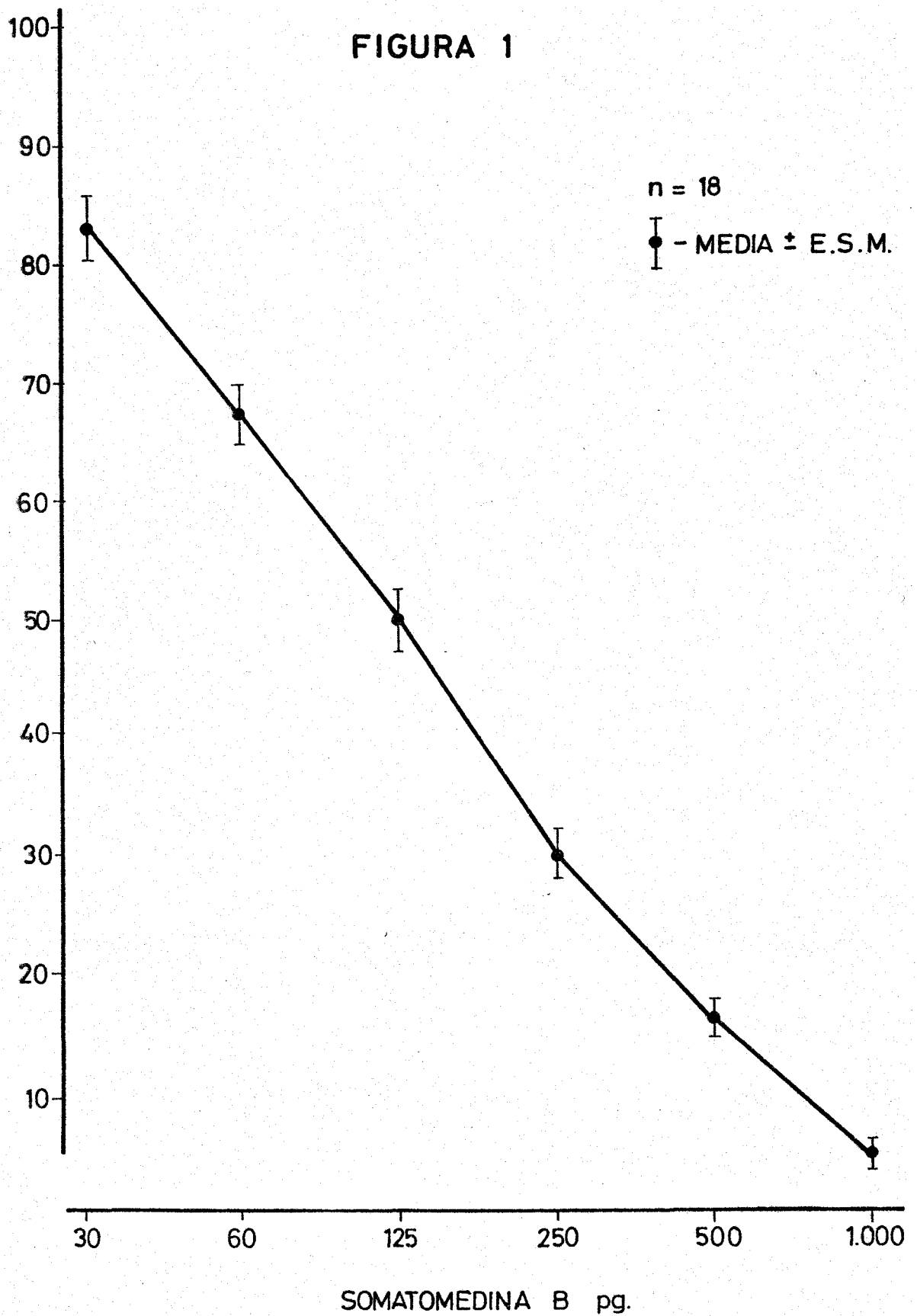
I) PRUEBAS DE VALIDACIONES HORMONALES

A) RIA de Somatomedina B

En la figura 1 se muestra una curva standard compuesta por los valores medios y los E.S.M. de 18 curvas standard individuales. Su representación es semilogarítmica. Puede apreciarse la linealidad entre 30 y 500 pg., así como la gran reproductibilidad de "binding" existente en las diferentes concentraciones standard, sobre todo considerando que las curvas fueron desarrolladas usando SM-B obtenida en diferentes marcajes.

En el cuadro I mostramos algunos de los resultados obtenidos en las diversas pruebas de validación del RIA de SM-B. El límite de sensibilidad en tubo es de 30 pg. Las pruebas de recuperación ofrecieron unos resultados que oscilaron entre un valor medio de 91 % cuando se adicionaron 500 pg. a un tubo que contenía una muestra de 67 pg., hasta 104 % cuando la adición a la muestra fué de 62,5 pg. El coeficiente de variación interanálisis es de 16 % sobre 10 determinaciones de una misma muestra de 6,17 µg/ml de concentración media, siendo de 13,5 y 14,9% el coeficiente de variación intraanálisis para la misma muestra. Fi-

FIGURA 1



PRUEBAS DE VALORACION DEL R.I.A. DE SOMATOMEDINA B

SENSIBILIDAD DE CURVA STANDARD µg.	RECUPERACION		PRECISION - C.V.		ESPECIFICIDAD
	MEDIA	D.S. (n)	INTRAANALISIS	INTERANALISIS	CURVA: DOSIS-RESPUESTA
	P - 67 µg.		%	%	r
30	P + 500	91 ± 13	13,5 - 14,9	16	0,92
	P + 250	101 ± 10			
	P + 125	102 ± 9.1			
	P + 62.5	104 ± 8.5			

CUADRO I

nalmente, se puede observar el alto grado del coeficiente de correlación ($r= 0,92$) obtenido al relacionar las - concentraciones leídas en curva y las diferentes diluciones a que se sometió un mismo plasma.

- B) Las restantes determinaciones radioinmunológicas hormonales son habituales en nuestro laboratorio y sus correspondientes pruebas de validación se detallan en la tesis doctoral de HERRERA JUSTINIANO, E. (81).

II) RESULTADOS OBTENIDOS

A) Comparación de niveles de SM-B entre la población sana y los sujetos cirróticos.-

En la figura 2-a se muestra la distribución de valores individuales en las dos poblaciones estudiadas. Si bien, hay entre ellas una zona de superposición, puede observarse cómo los valores que corresponden al conjunto de cirrótico (n=42) tienden a agruparse en la zona inferior, quedando el 76,2 % de la población por debajo de la zona del valor medio \pm D S (5,11 \pm 3,22). La distribución de valores en el conjunto de los sujetos sanos (n=33) tiende a situarse por encima de estos valores (9,07 \pm 3,84).

En la figura 2-b se representan estos mismos resultados en digrama de barras con las respectivas desviaciones standards y la significatividad entre diferencia de medias ($p < 0,001$)

B) Relación entre SM-B y otros parámetros de disfunción hepática presentes en la cirrosis.-

1) Síntesis de enzimas y proteínas normalmente mantenidas por el hígado.

Dentro de éste grupo de parámetros destacaremos los resultados obtenidos al estudiar la correlación entre SM-B y el tiempo de protrombina de los pacientes. En la fig. 3 queda reflejada la distribución de puntos en sistema cartesiano. Se observa cómo existe, globalmente, una tendencia a valores altos de SM-B con los mayores porcentajes en el tiempo de protrombina y viceversa, lo cual se refleja en una correlación positiva ($r=0,41$) que alcanza una significatividad estadística del orden del 2 %.

Al estudiar esta misma relación con respecto al fibrinógeno, se obtuvo un bajo coeficiente de correlación ($r=0,15$) en los 26 pacientes estudiados, sin significatividad estadística (Fig.4).

Tampoco se obtuvieron resultados significativos en la correlación entre los valores de SM-B con los de Albúmina y Colinesterasa plasmáticas. Sus grados de correlación fueron de 0,24 y 0,34, respectivamente. (Figuras 5 y 6).

FIGURA 2 a

SOMATOMEDINA - B ($\mu\text{g. / ml.}$)

23
20
15
10
5
0

n = 33

n = 42

NORMALES

CIRROTICOS

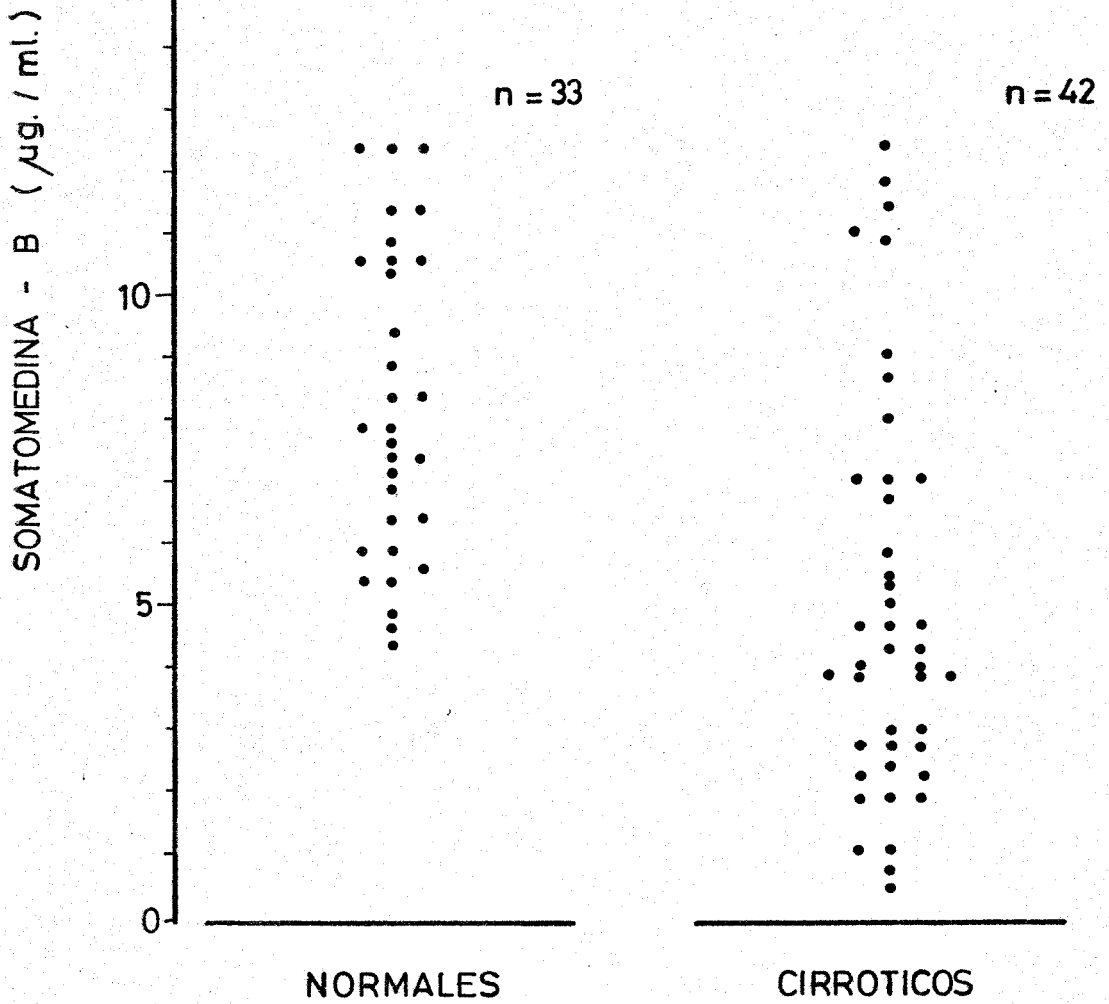
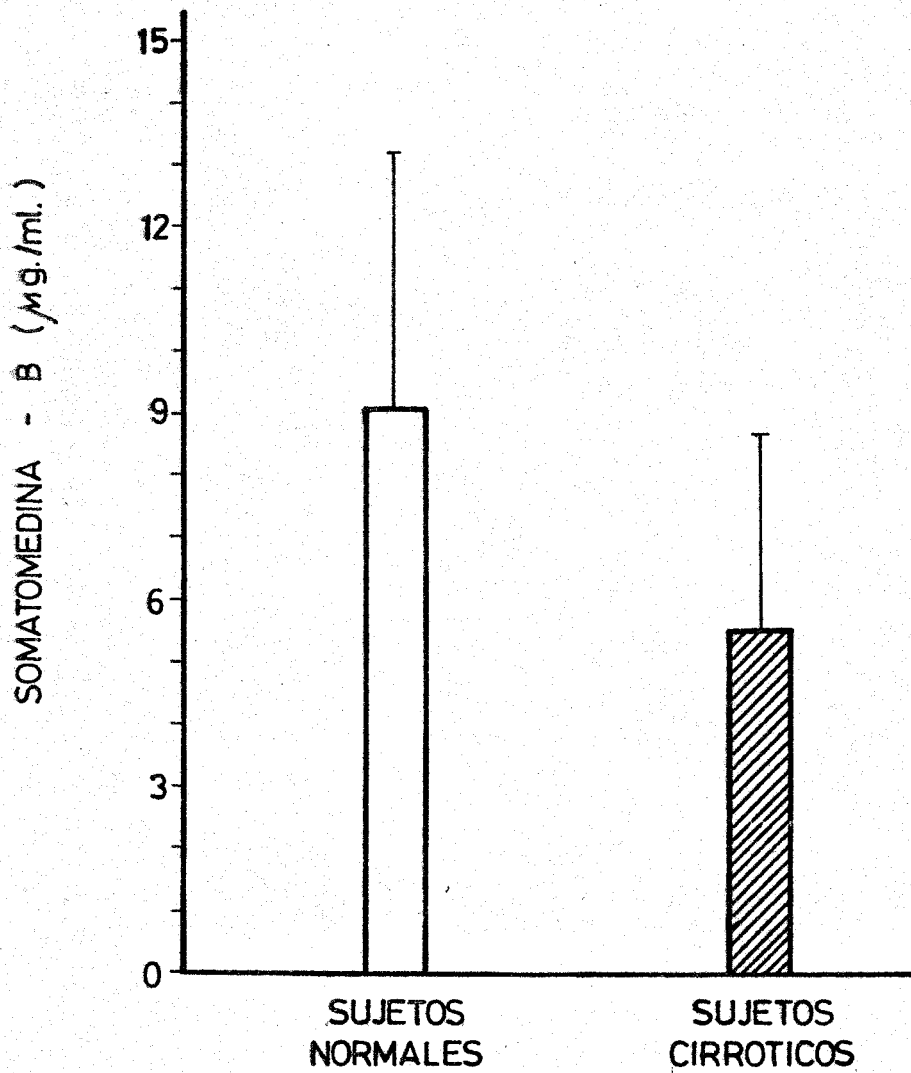


FIGURA 2 b

p < 0,001



VALORES MEDIOS ± D. S.

SOMATOMEDINA - B (µg./ml.)

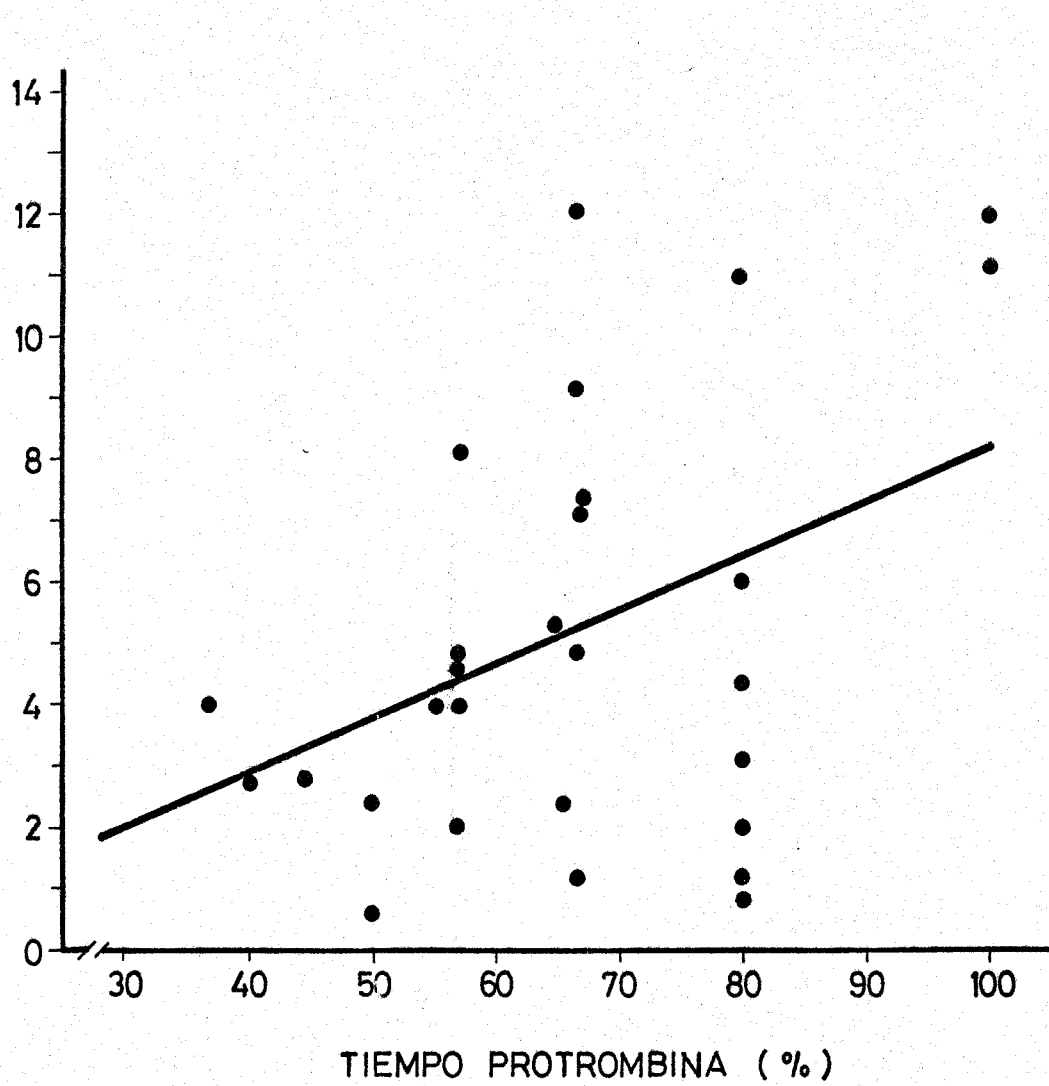


FIGURA 3

FIGURA 4

n = 26
r = 0,1487
N. S.

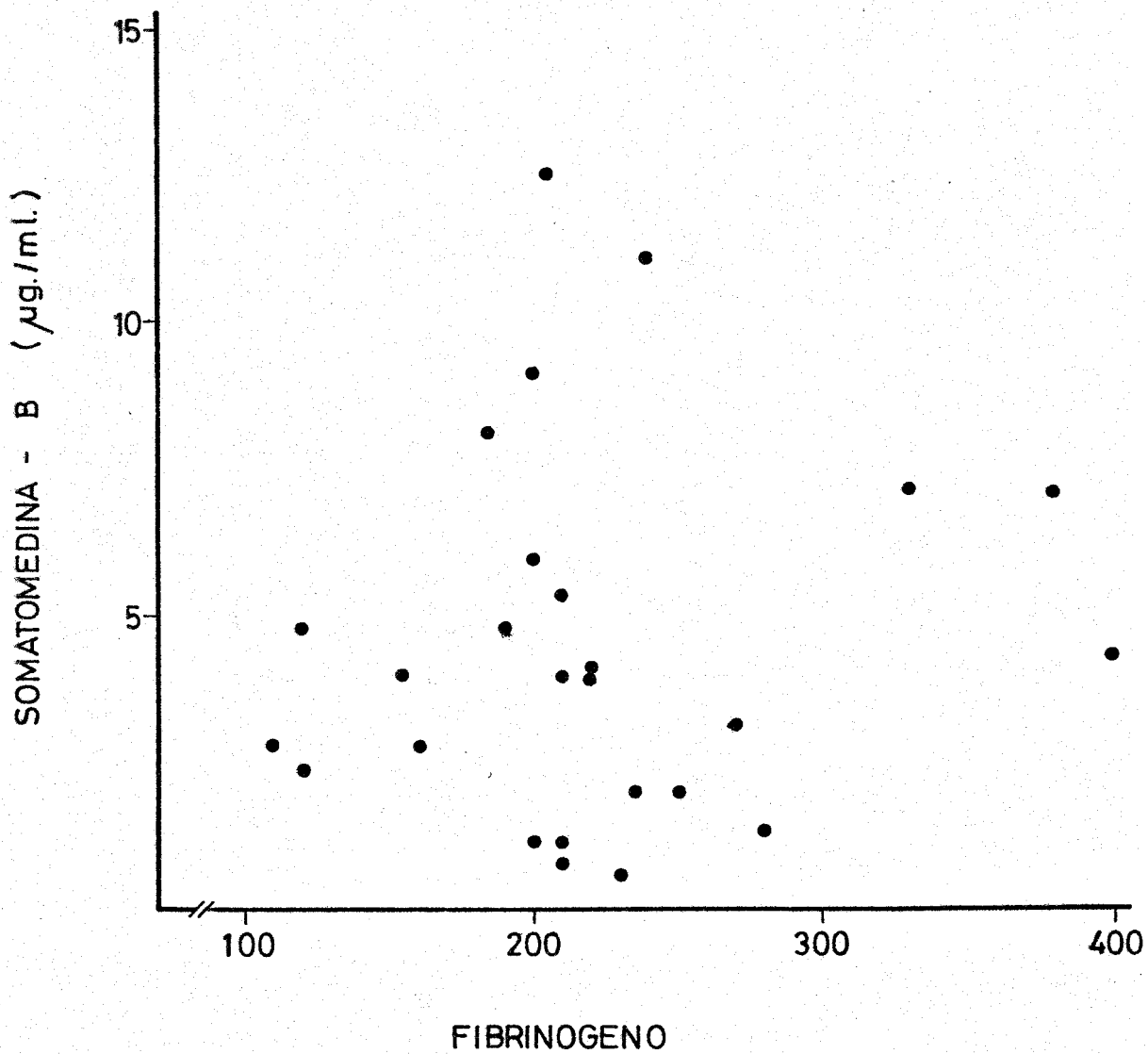


FIGURA 5

n = 42
r = 0,2436
N. S.

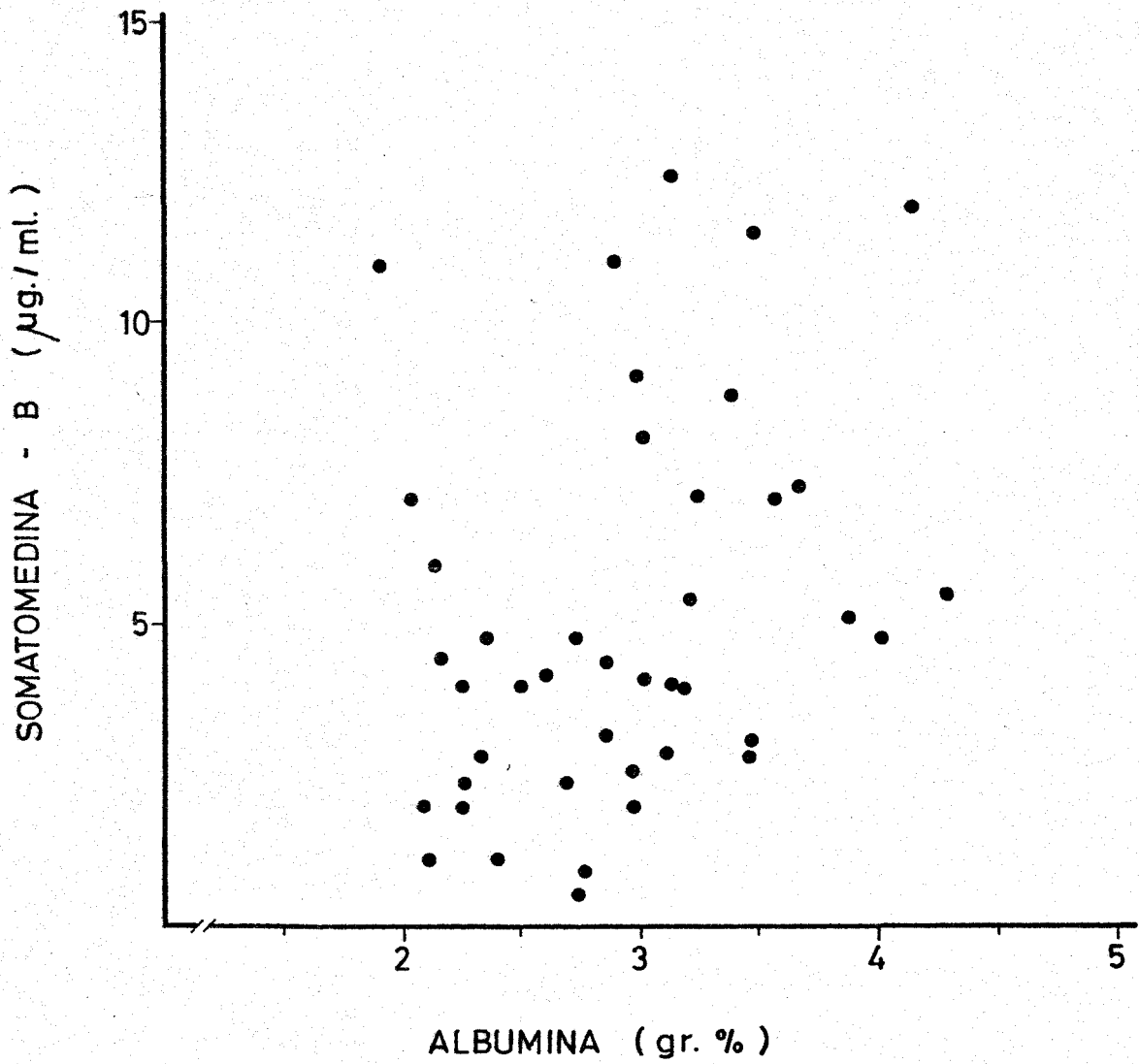
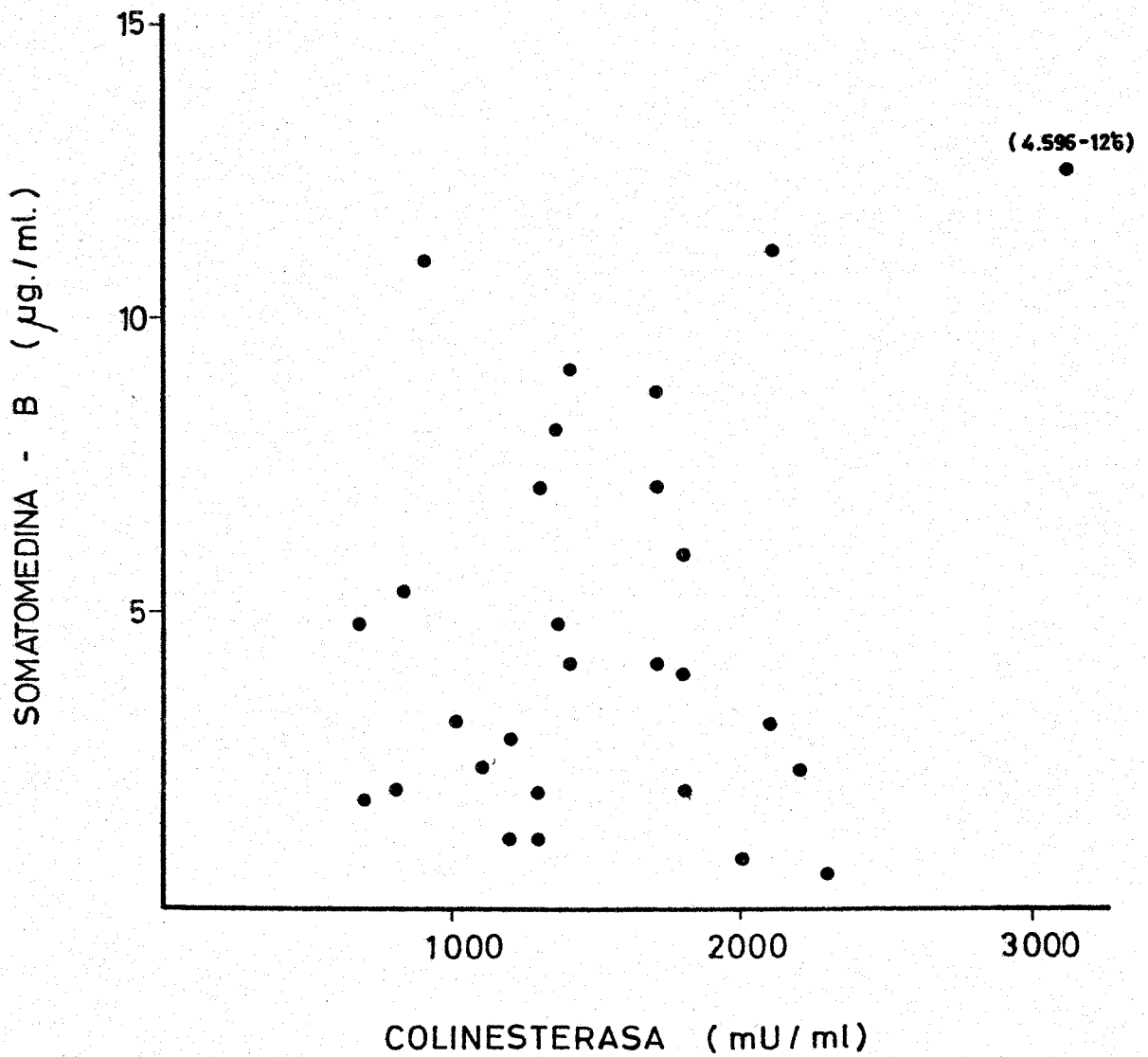


FIGURA 6

n = 28
r = 0.3376
N. S.



- 2) Sustancias eliminables por la bilis y patológicamente retenidas en la insuficiencia hepática.

El grado de correlación obtenido entre SM-B y Bilirrubina total fué muy bajo ($r=0,01$), comportándose ambos parámetros como variables independientes (Fig. 7).

El resultado semejante se obtuvo para con las cifras de fosfatasa alcalina ($r=0,026$). Estos valores se representan en la Fig. 8.

- 3) Depuración de Rosa de Bengala I¹³¹

El estudio de correlación entre SM-B y aclaramiento fraccional de Rosa de Bengala queda plasmado en la figura 9. En esta ocasión se obtuvo una correlación positiva ($r=0,50$) que alcanza un notable grado de significatividad estadística del orden de $p < 0,02$

- 4) Enzimas que se relacionan con el daño de la célula hepática.

En el estudio de correlación entre SM-B y TGP resultó un grado de correlación negativo y muy bajo ($r = -0,06$). En cuanto al resultado de la TGO, se obtuvo un grado de correlación positivo y algo mayor ($r = 0,23$) aunque

tampoco alcanza significatividad estadística. (Figuras 10 y 11)

5) Alteración de las proteínas plasmáticas como reflejo del fenómeno de inflamación crónica del hígado. Se analizaron las correlaciones entre SM-B y las distintas fracciones del proteinograma, tanto en sus valores absolutos como porcentuales. Los resultados fueron:

- Con respecto a la fracción gammaglobulina, un coeficiente de correlación de bajo grado y negativo (fig. 12)
- Un grado de correlación también bajo pero positivo ($r = 0,13$) para con las cifras de proteínas totales (fig. 13)
- Y también positivo y algo mayor ($0,24$) en lo referente a esta relación con el cociente Albúmina/Gamma, si bien, tampoco suficiente para alcanzar significatividad estadística (fig. 14).

C) Relación entre SM-B y parámetros que reflejan el estado hemodinámico del lecho hepático.-

La figura 15 representa un gráfico de dispersión -

con los pares de valores obtenidos de SM-B y aclaramiento fraccional de oro coloidal. Se puede apreciar cómo los valores máximos de una variable se relacionan con los máximos de la otra, al igual que los valores mínimos también se agrupan en ambas, lo que numéricamente se traduce en un grado de correlación positivo ($r= 0,51$) con una significatividad estadística del orden de un 1 %.

Mediante la correspondiente conversión numérica, el flujo sanguíneo circulante portal se deduce del anterior parámetro. Los resultados quedan reflejados en la gráfica 16, que, como se puede ver, es casi superponible a la anterior, lo cual era de esperar, ya que todos los valores sufren igual modificación. La relación lineal directa es muy manifiesta y conserva igual grado de significatividad ($p < 0,01$)

A través de los valores de aclaramiento parenquimatoso (Rosa de Bengala) y del SRH (Oro coloidal), se obtienen los de Eficacia Depuradora de la Hepatona (E. D. H.). La correlación entre SM-B y E. D. H. se representa en la fig. 17. En esta ocasión el grado de correlación se hace muy bajo ($r= 0,15$) y no alcanza significatividad estadística.

FIGURA 7

n = 20
r = 0,0100
N. S

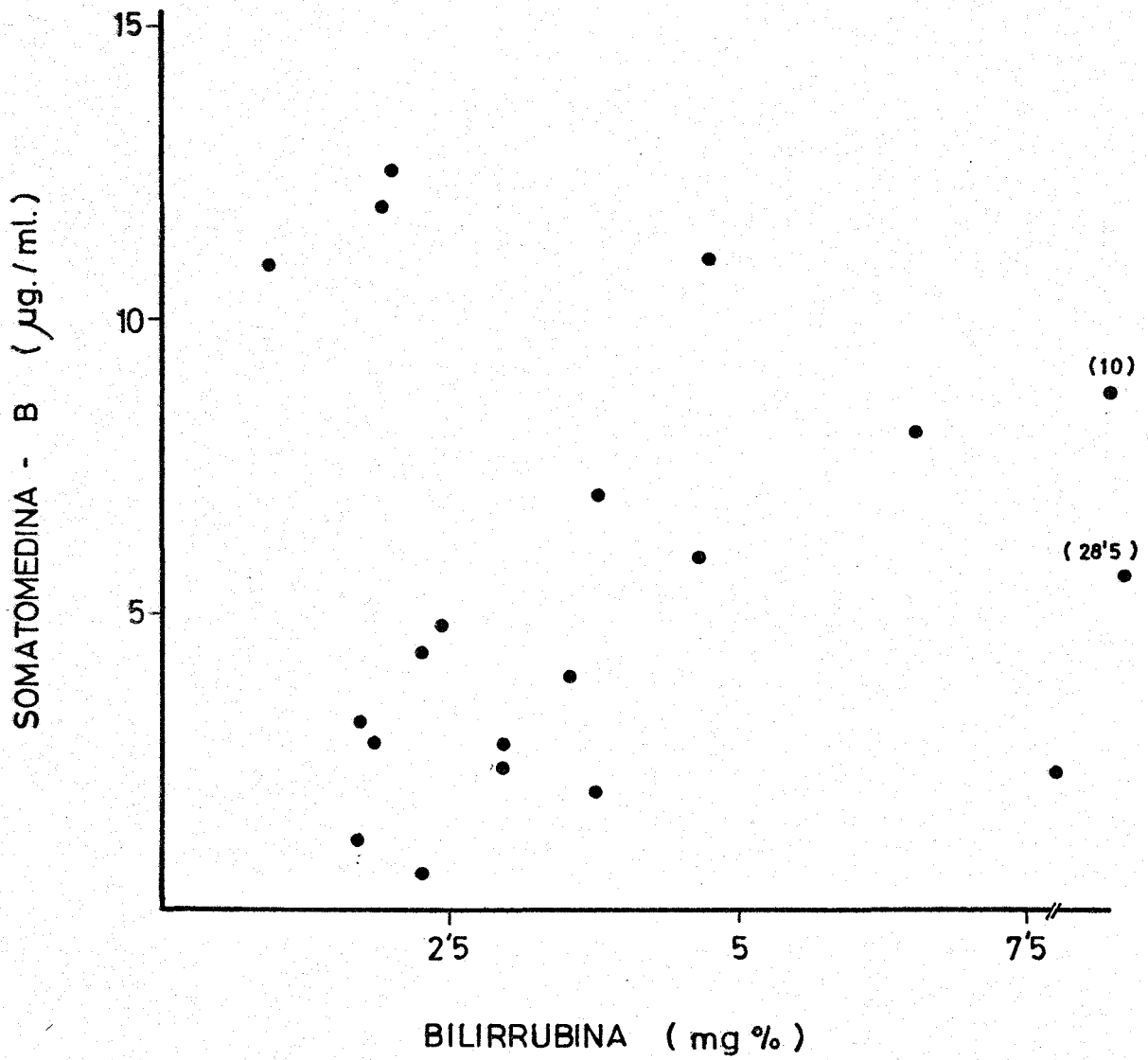


FIGURA 8

n = 20
r = 0,0267
N. S

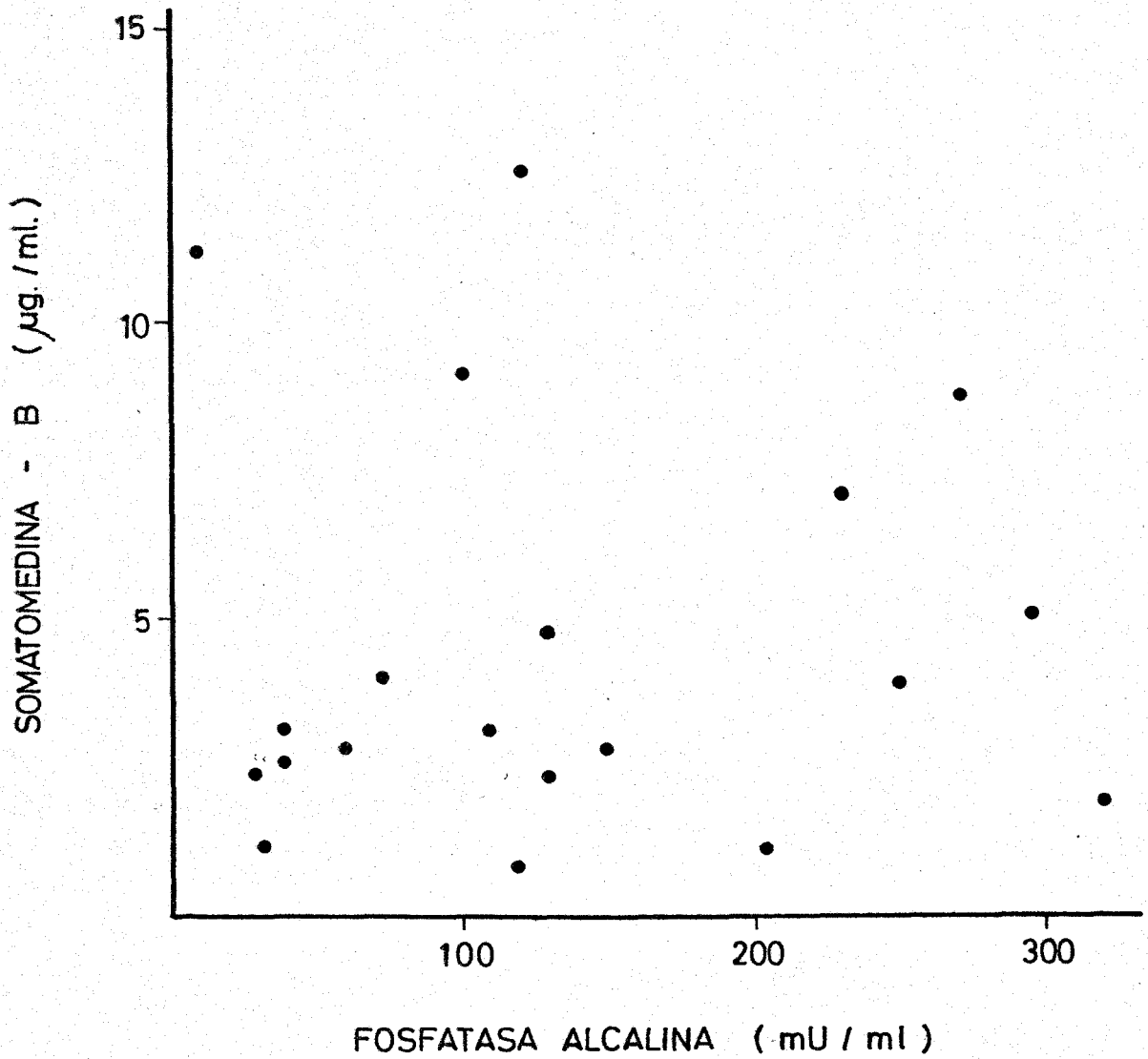


FIGURA 9

$g = 0,36 + 1,70 x$
 $n = 19$
 $r = 0,4965$
 $p < 0,02$

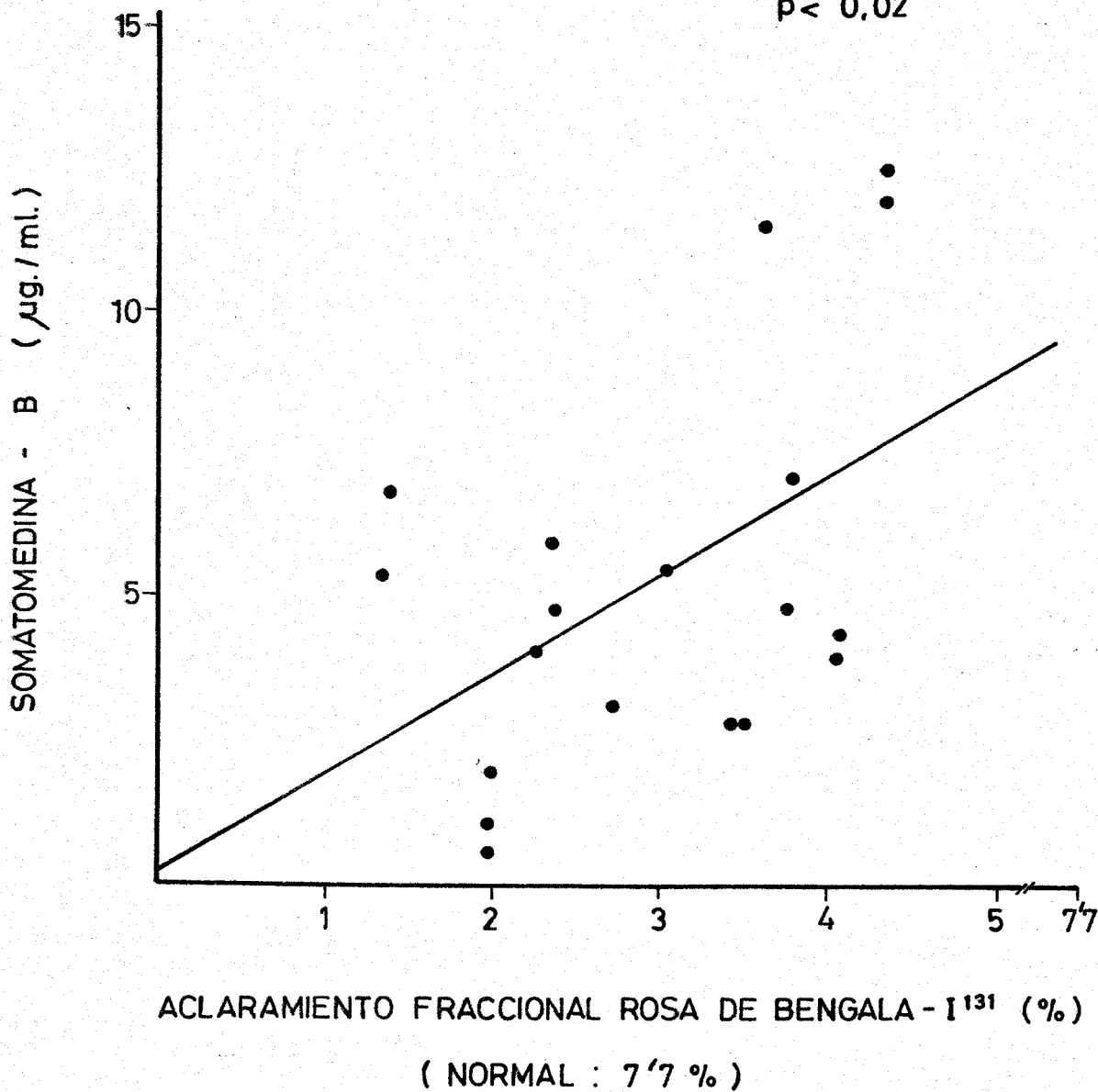


FIGURA 10

n = 24
r = 0,0571
N. S.

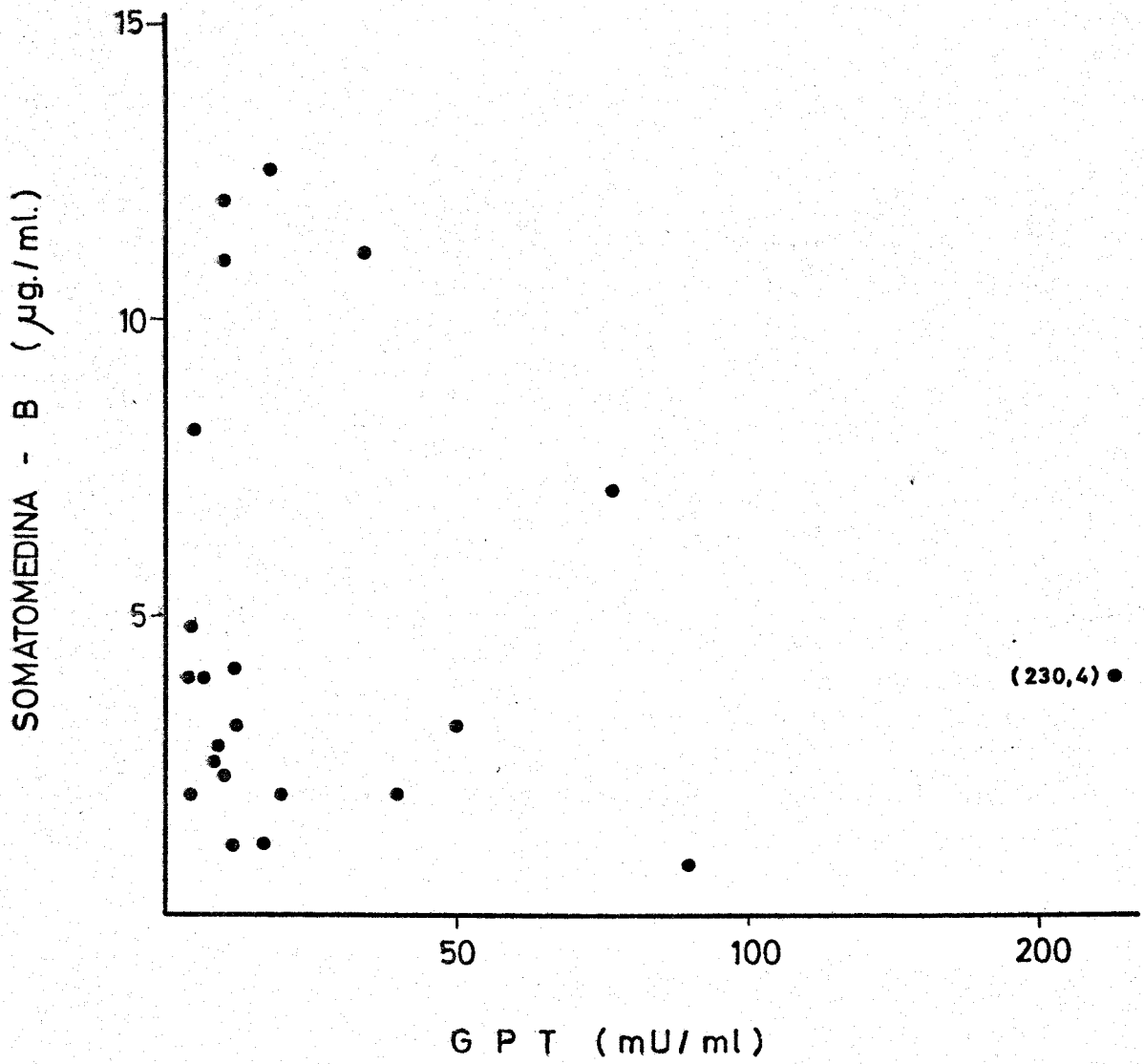


FIGURA 11

n = 30
r = 0,2318
N. S

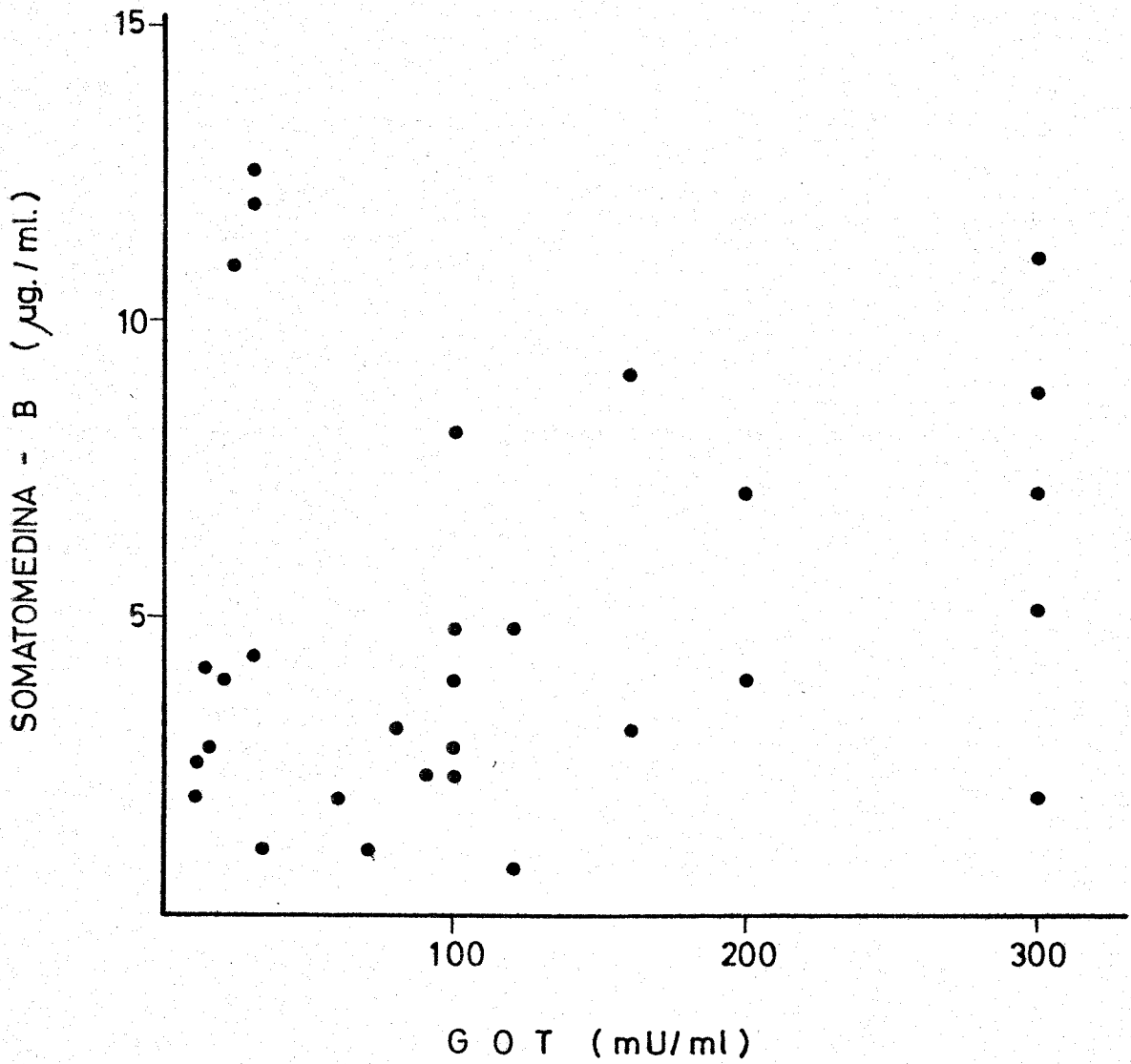


FIGURA 12

n = 42
r = - 0,189
N. S.

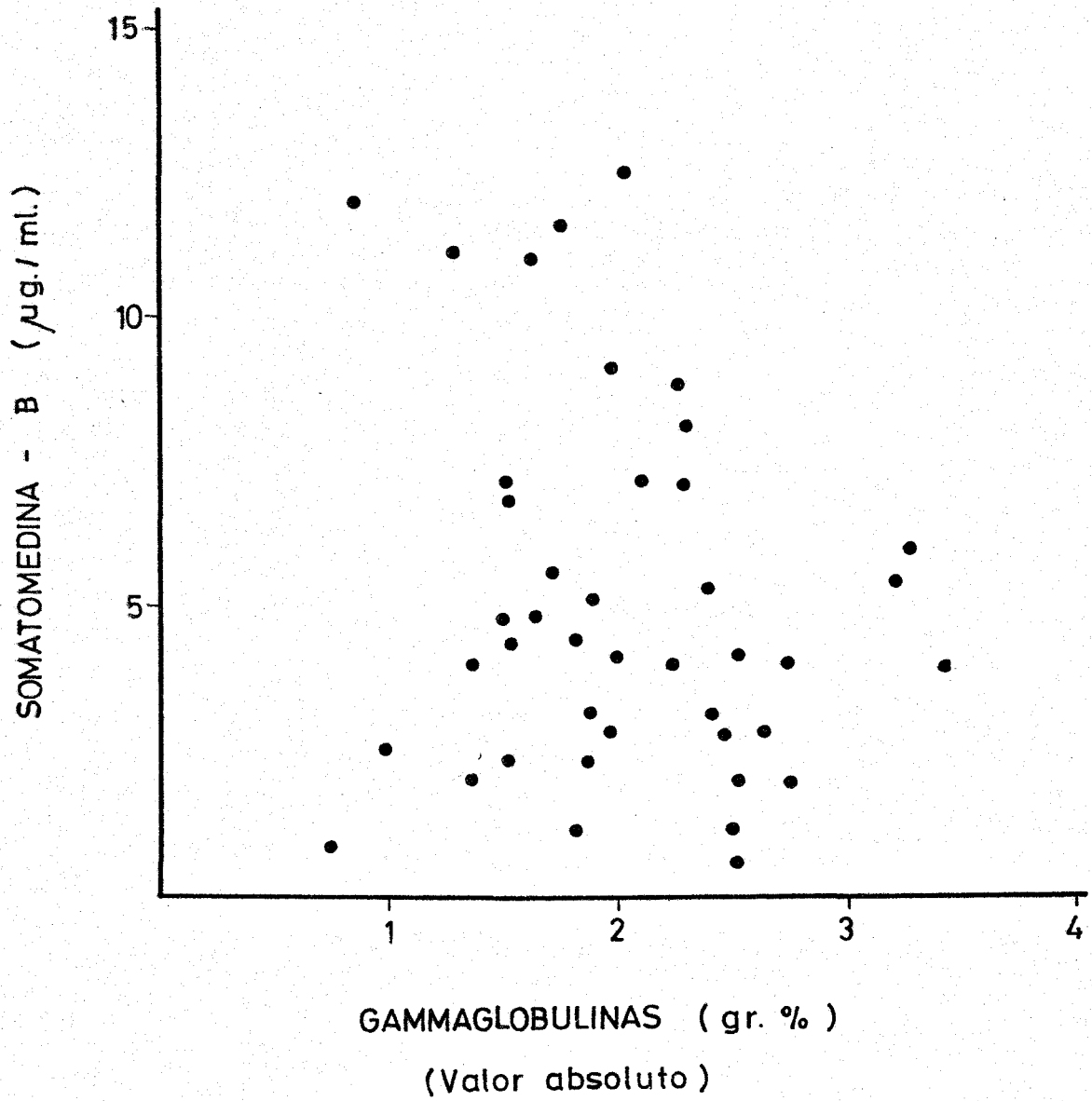


FIGURA 13

n = 42
r = 0,127
N. S.

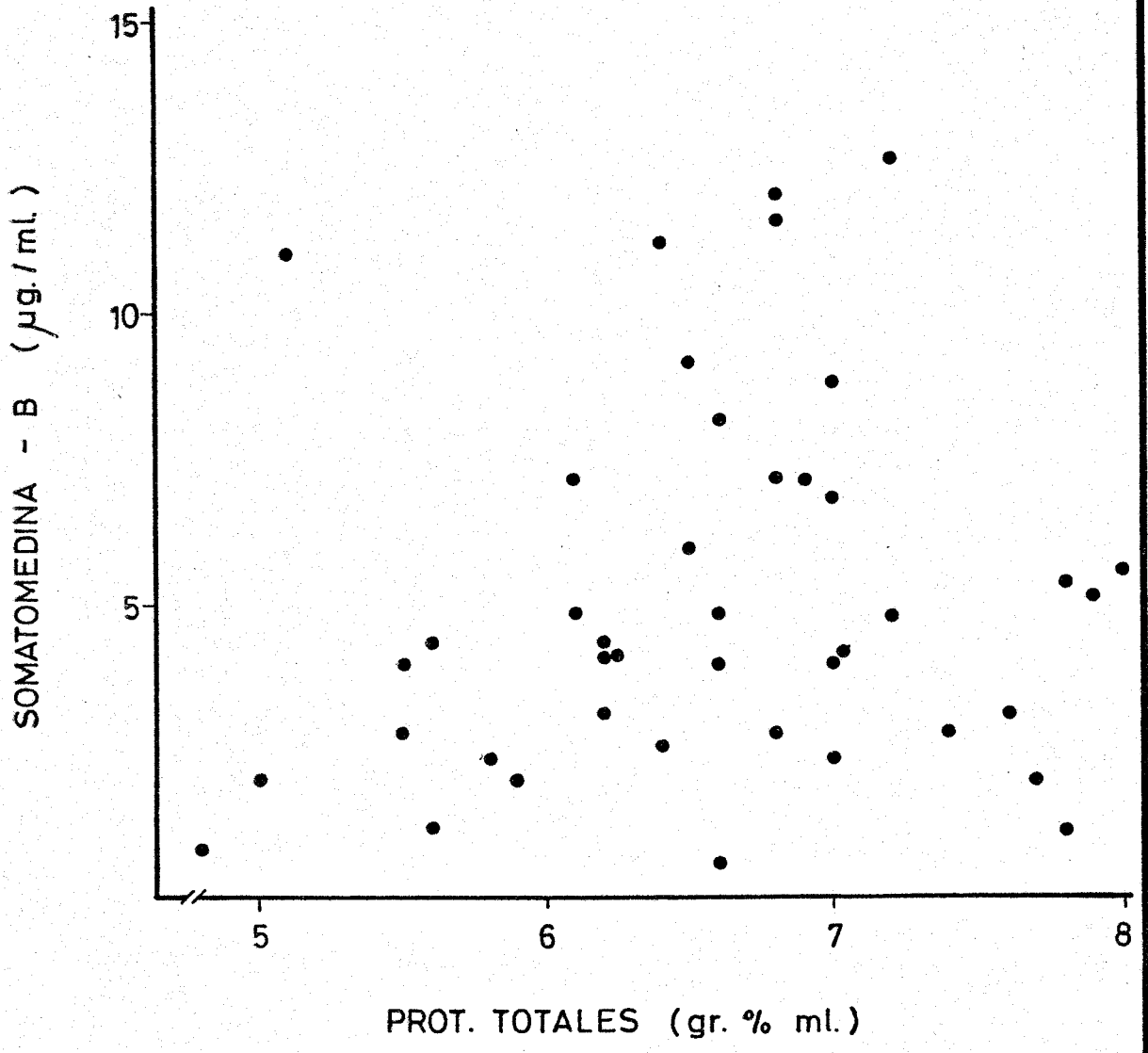
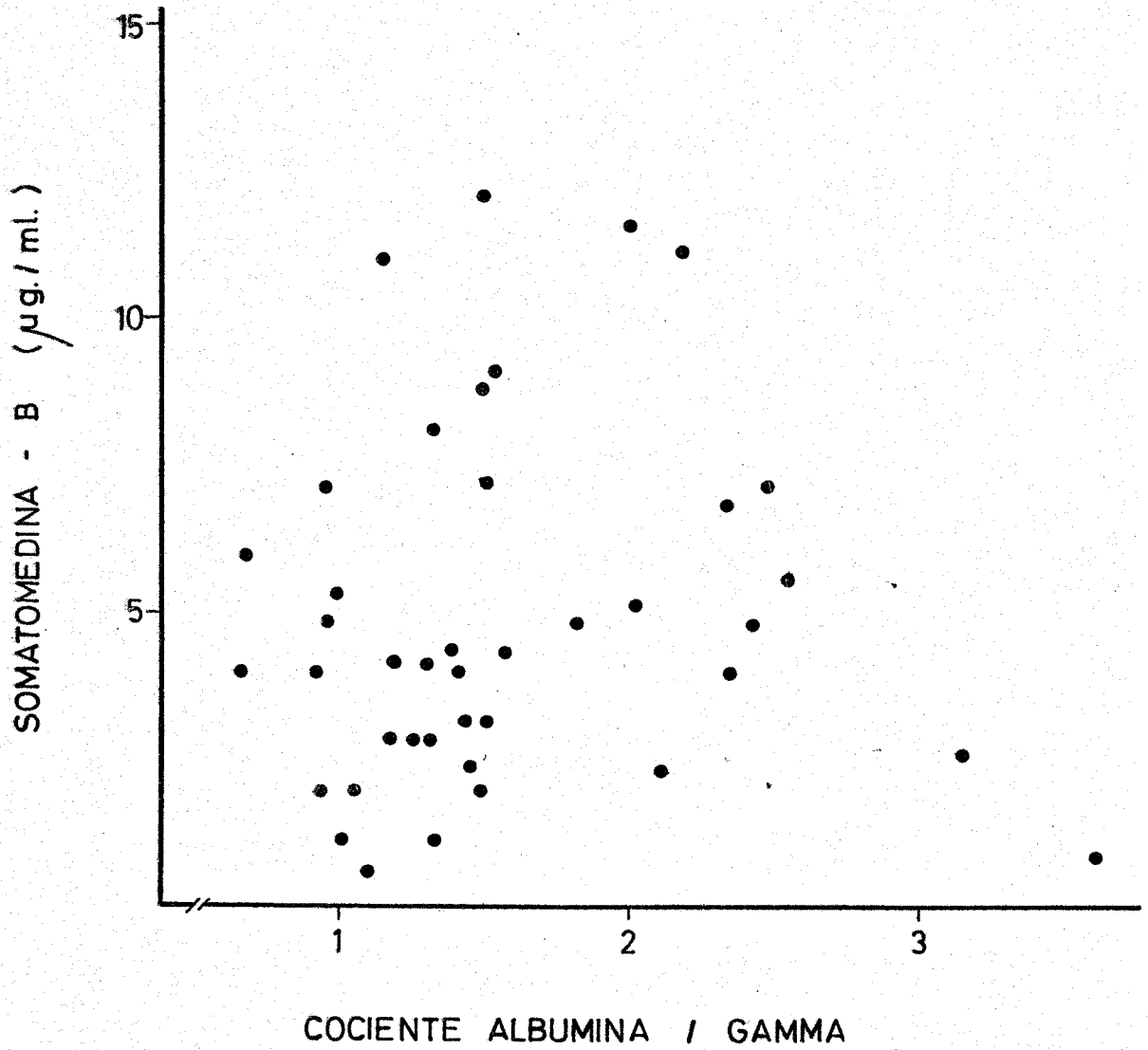


FIGURA 14

n = 42
r = 0,2445
N. S.



SOMATOMEDINA - B ($\mu\text{g. / ml.}$)

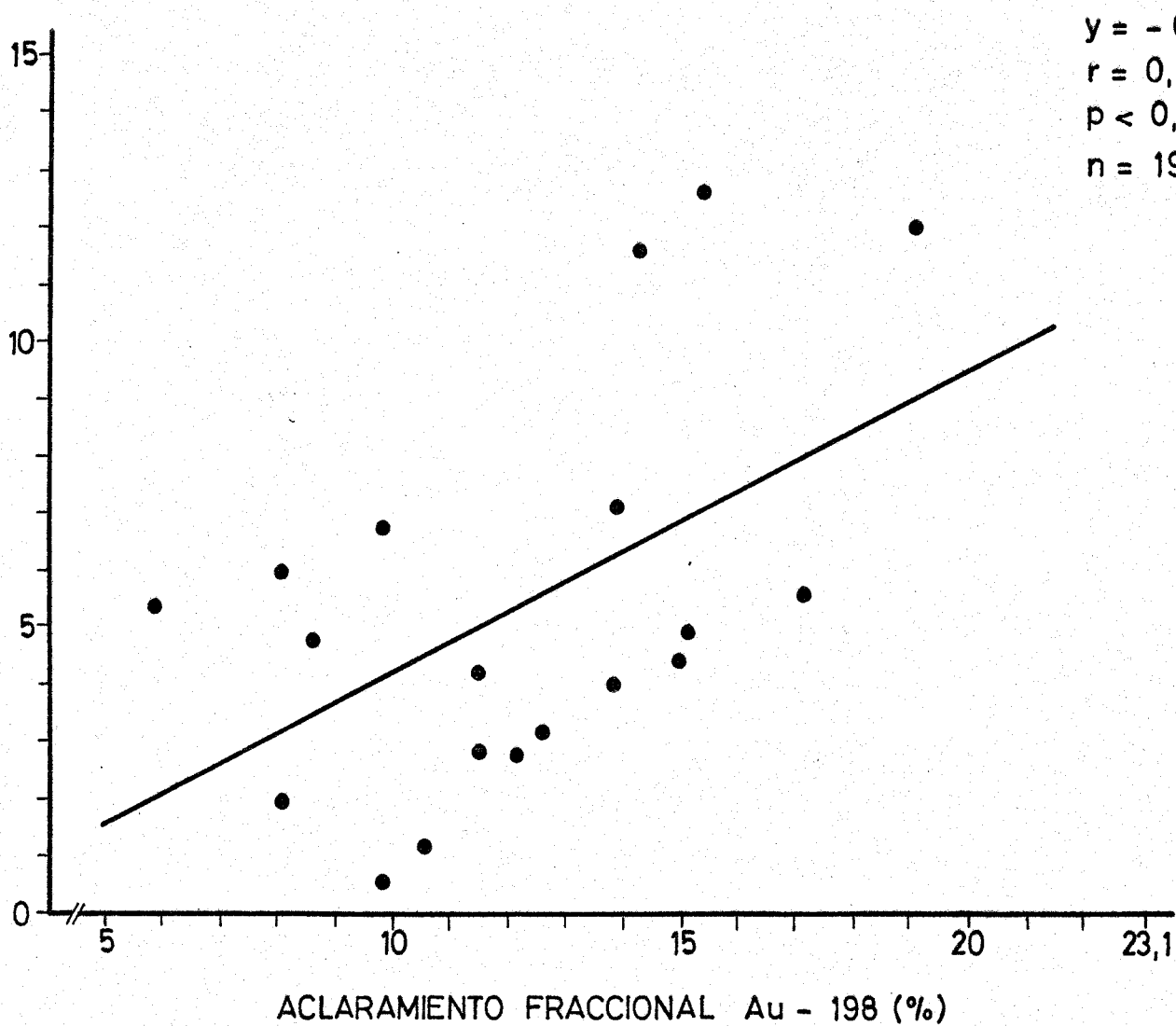


FIGURA 15

SOMATOMEDINA - B ($\mu\text{g./ml.}$)

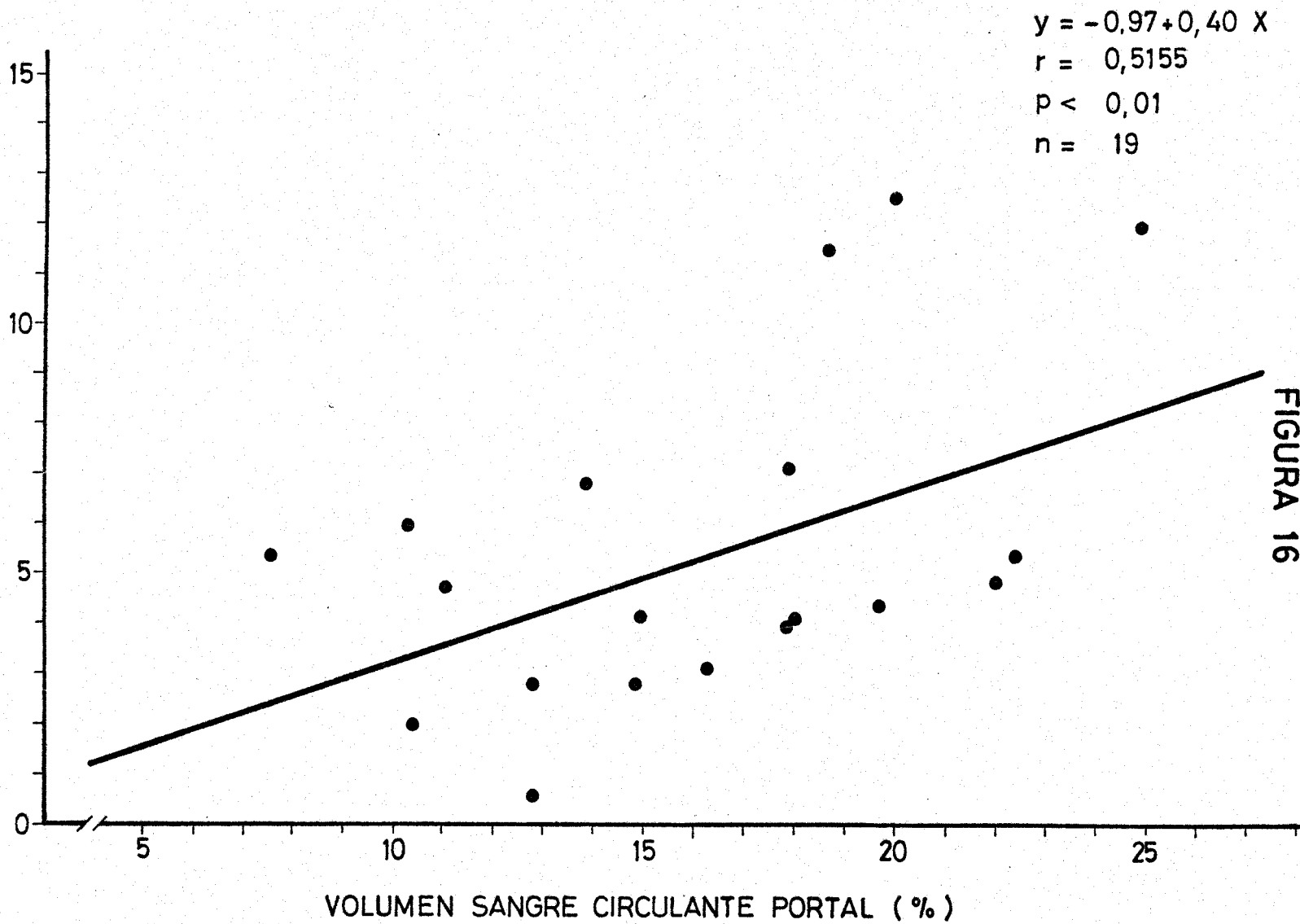
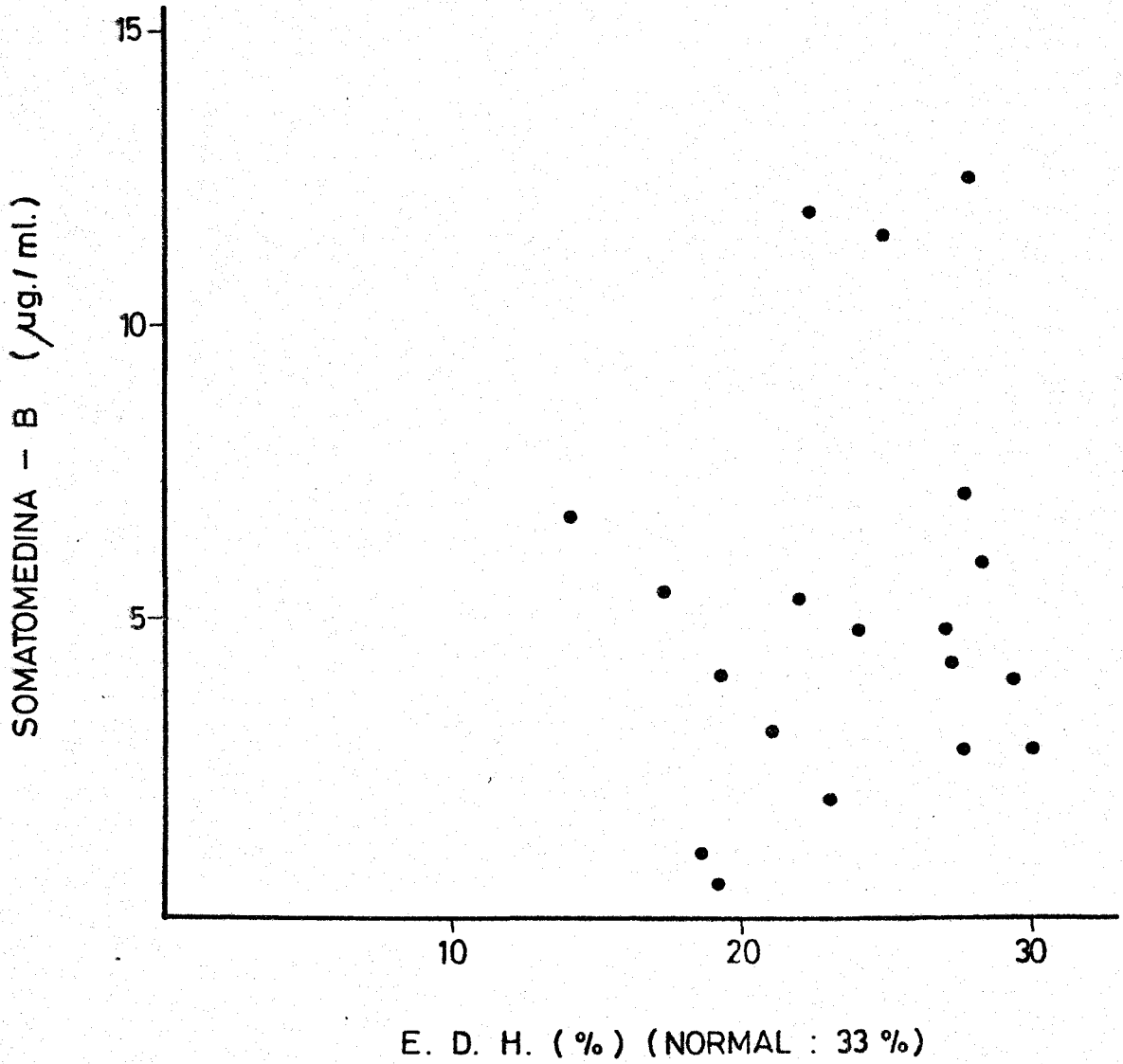


FIGURA 16

FIGURA 17

n = 19
r = 0,1480
N. S.



D) Alteraciones hormonales hepatoinducidas.-

- 1) Se estudió la posible relación existente entre SM-B y Estradiol encontrándose, en los 25 casos testados, un coeficiente de correlación bajo y de signo negativo - ($r = -0,23$). (Fig. 18).
- 2) De similar valor absoluto y también de signo negativo fué el grado de correlación para con los niveles basales de insulinemia ($r = -0,27$), sin que sea suficiente para ser estadísticamente significativo. (Fig. 19).

E) Relación entre SM-B y hGH.-

1) Situación basal

En la fig. 20 se analiza la relación entre hGH y SM-B, representando los valores de la primera en eje de ordenadas y en abscisas los de la segunda. En ella se puede apreciar que los valores más altos de SM-B se suelen corresponder con los más bajos de hGH y viceversa, lo cual viene expresado numéricamente por un coeficiente de correlación negativo ($r = -0,39$) con notable valor de significatividad estadística del orden del 2 %.

FIGURA 18

n = 25
r = 0,2311
N. S.

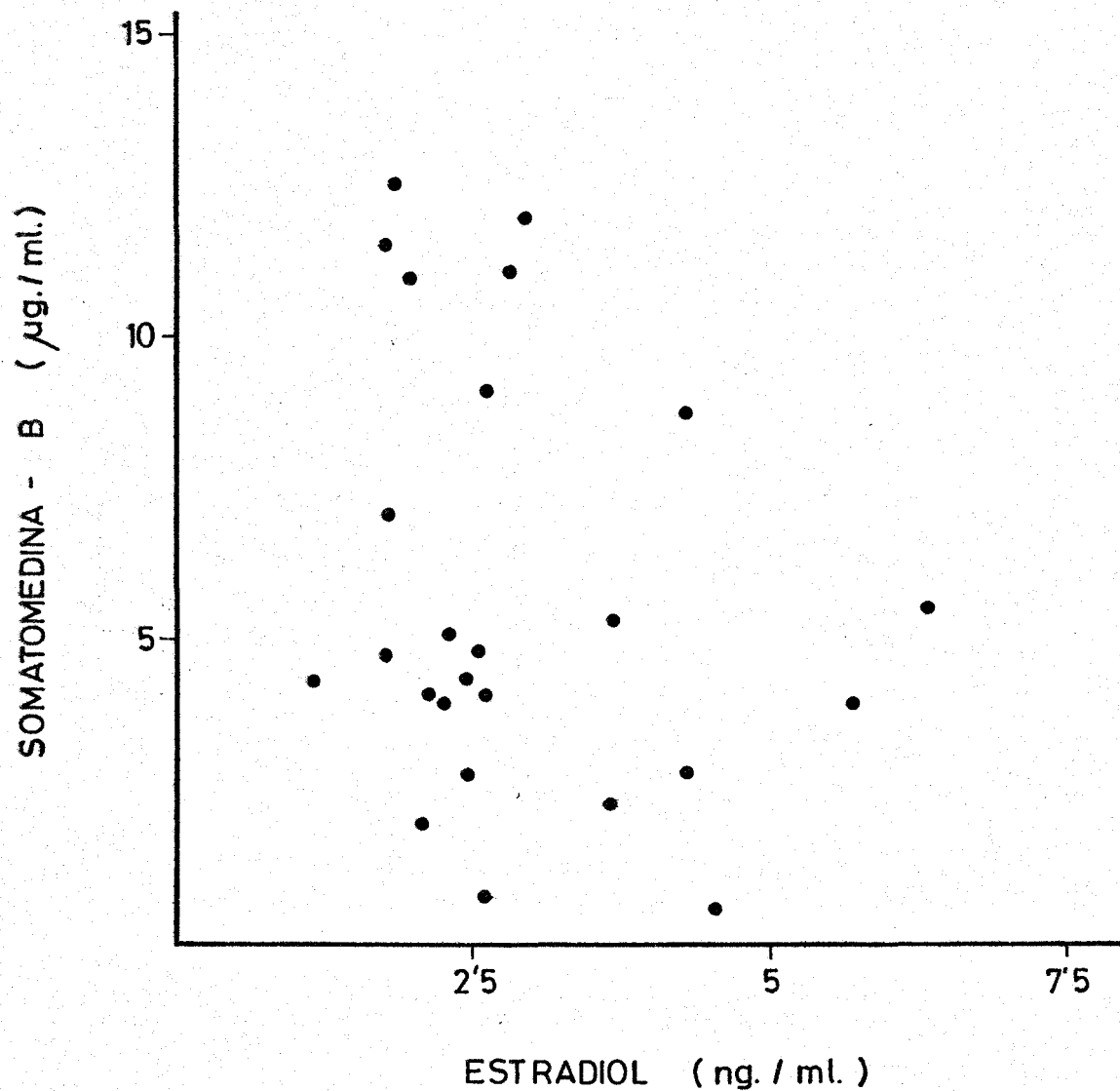
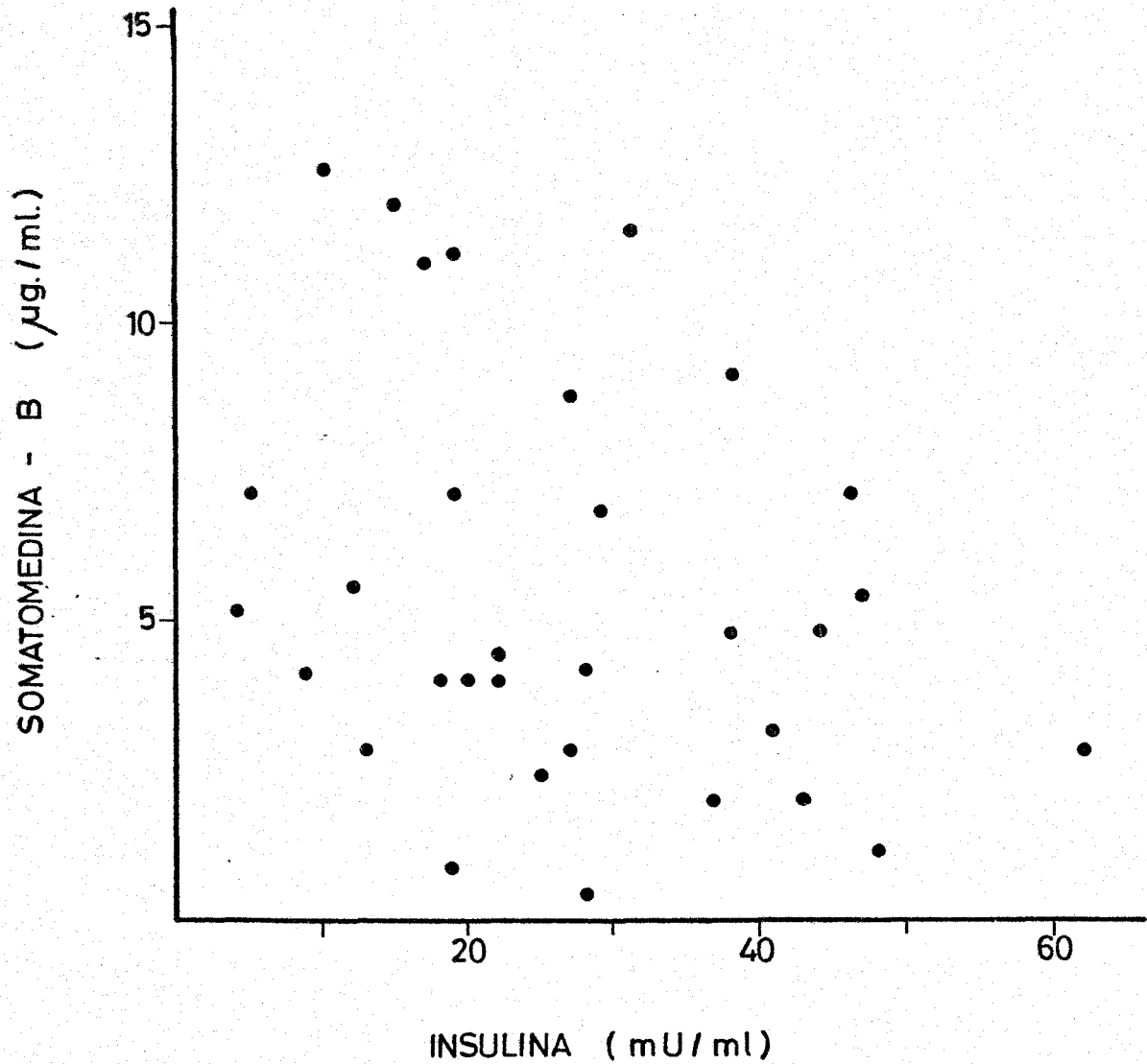


FIGURA 19

n = 32
r = 0,2682
N. S.



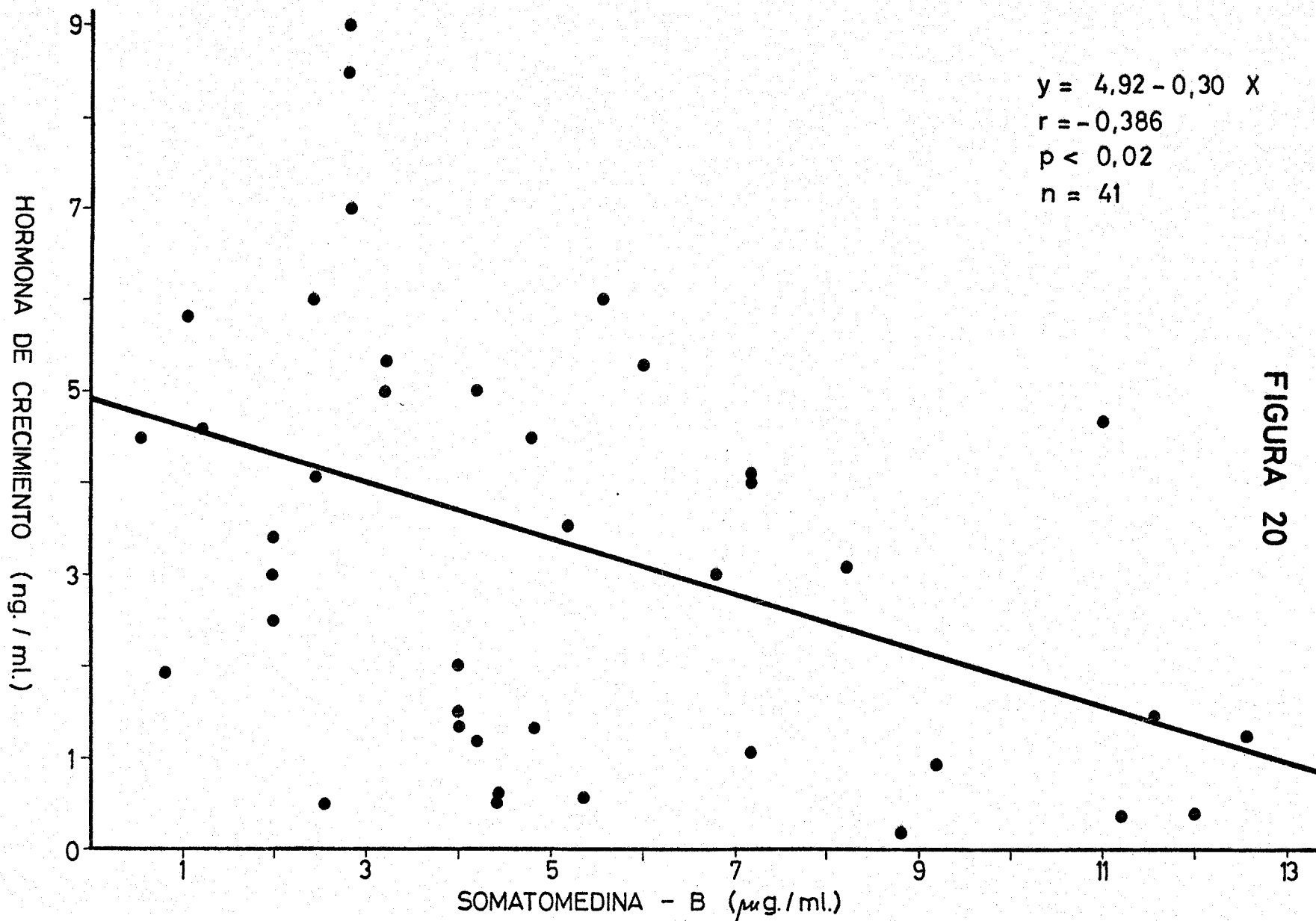


FIGURA 20

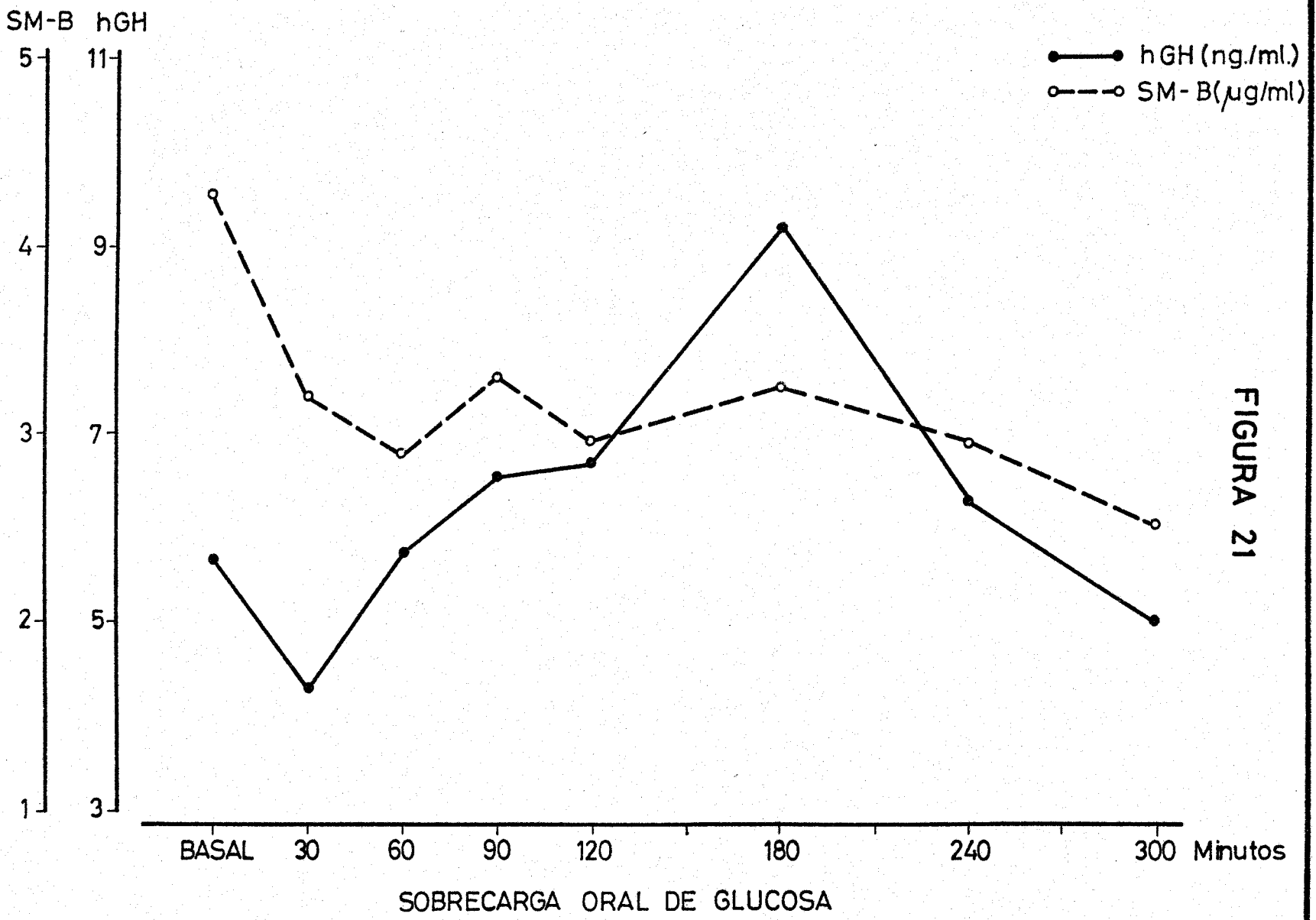
2) Situación dinámica

En 14 sujetos cirróticos, tanto la hGH como la SM-B fueron seguidas a lo largo de 5 horas tras la sobrecarga oral de glucosa. En otros 5 casos se siguieron durante 120 minutos. En la gráfica 21 se representan las curvas de valores medios obtenidos. En ella se puede apreciar cómo a lo largo del tiempo controlado los valores de SM-B tienden a descender, mientras que la hGH muestra mayor irregularidad, aunque -- dentro de las grandes oscilaciones individuales, tiende a elevarse, con un incremento máximo a las tres horas.

En los cuadros II y III se muestran los valores individuales con su desviación standard para hGH y SM-B, respectivamente.

No se encontró correlación entre los valores de hGH y SM-B en los distintos tiempos de la curva.

FIGURA 21



CUADRO II

CURVAS hGH

	BASAL	30'	60'	90'	120'	180'	240'	300'
J. C. M.	3,4	3,1	4,6	19,8	18,3	7,2	8,8	10
L. M. G.	0,4	0,3	0,6	0,7	0,2	-	-	-
J. S. P.	5	3,35	6,6	3,6	5,8	-	-	-
M. J. R.	4,6	1,6	1,6	5	15,6	10	3,8	3
A. B. M.	1,3	1,4	1,4	0,6	8,5	10,2	9	7
A. D. C.	1,2	0,7	0,8	1	3,7	4,5	4,4	10
S. R. R.	4	0,7	0,5	0,3	0,5	0,8	0,4	0,5
A. B. N.	3,85	3,25	2,85	2,55	1,65	8,2	10,2	6,4
R. C. R.	8	6,2	6,1	5,45	9,1	12,6	5	5,3
J. V.	4,75	3,55	4,6	7,75	3,7	2,15	2,25	1,45
A. C.	4,3	3,9	3,5	6,7	7,25	22,5	11,8	3,15
L. N.	8,5	3,65	6,4	11,8	5,5	3,3	4,9	3,5
F. D. R.	1,7	3,15	6,4	4,75	4,6	20	9,5	4,25
C. R.	20	8,4	15	12,6	9,6	7,75	6,25	6,7
J. G.	3,5	3,15	3,15	2,05	6,15	8	4,1	2,7
D. L.	7,35	8,75	14	30	15,6	8	7,5	6
M. B.	1,25	1,2	1,35	1,25	1,45	-	-	-
F. G. V.	6,5	4,9	4,2	2,7	2,55	-	-	-
J. B.	18	20	25,5	-	7,5	-	-	-
M.	5,66	4,28	5,74	6,59	6,70	8,94	6,28	5
D. S.	5,25	4,48	6,26	7,77	5,20	6,16	3,28	2,89
E. S.	1,21	1,03	1,44	1,83	1,19	1,65	0,88	0,77

CUADRO III

CURVAS SM - B

	BASAL	30'	60'	90'	120'	180'	240'	300'
J. C. M.	2	2,8	2,4	0,4	0,8	2	2	1,2
L. M. G.	12	4,2	3,2	4	3,8	-	-	-
J. S. P.	4	2	4,4	3,2	4,2	-	-	-
M. J. R.	1,2	1,6	0,4	1,6	0,6	0,4	0,8	0,8
A. B. M.	4,8	3,6	3,2	3,2	2	3,4	3,2	2,4
A. D. C.	4,2	5,2	4,2	4,4	2,4	3,6	3,2	3,2
S. R. R.	7,2	4,8	4,4	4,8	5,6	5	5,2	3,2
A. B. N.	8,2	8,2	-	6	6,4	8,2	8,8	6,2
R. C. R.	1,2	1,2	0,4	4,2	0,4	2	0,4	0,4
J. V.	3,2	2,8	3,2	3,6	3,6	2,4	2,4	2
A. C.	0,8	1,2	0,8	0,4	1,6	2,4	1,6	1,2
L. N.	2,4	2,4	2	4,4	2	2	1,2	2,6
F. D. R.	4	3,6	3,4	3,2	2,4	3,2	2	2
C. R.	4,8	3,8	3,8	5,4	5,2	5,2	4,2	3
J. G.	4	4	4,4	2,6	2,8	-	2,4	2,8
D. L.	6	2	2,6	2,6	2,4	2,4	3,6	4,2
M. B.	2,6	2	2,4	2,4	3,6	-	-	-
F. G. V.	3,2	2,6	2,8	2	1,6	-	-	-
J. B.	5,4	2,4	4	4,8	4,4	-	-	-
M.	4,28	3,18	2,89	3,33	2,94	3,23	2,93	2,51
D. S.	2,72	1,68	1,31	1,55	1,70	1,97	2,14	1,50
E. S.	0,62	0,39	0,31	0,36	0,39	0,55	0,57	0,40

EPICRITICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Tras el desarrollo del radioinmunoanálisis de SM-B por YALOW y cols (48) se perfiló el concepto de dependencia entre SM-B y hGH al constatar altos niveles plasmáticos en enfermos acromegálicos y bajos en estos mismos pacientes tras el tratamiento radical que iba seguido de una caída de hormona de crecimiento, así como en sujetos con hipopituitarismo con déficit de hGH de otras etiologías. La referencia para hablar de niveles altos o bajos, obviamente, son los correspondientes a sujetos sanos. Los niveles medios encontrados para este grupo por los citados autores fué de $9,8 \pm 1,7$ $\mu\text{gr/ml}$. No obstante, en una posterior comunicación en la que se estudiaron los niveles plasmáticos de SM-B en un grupo de 8 sujetos adultos normales a las 12 horas, así como la excreción urinaria entre las 10 y las 14 h, el valor medio de los niveles circulantes en plasma fué de $5,9 \pm 0,9$ $\mu\text{gr/ml}$. Si ésto era debido a variaciones diurnas o a diferencias en la selección del grupo, no se dilucidó en este estudio (46).

Datos aún no publicados realizados recientemente en nuestro laboratorio sobre un numeroso grupo de adultos sanos de

ambos sexos no parecen apoyar estas variaciones horarias tan amplias, aunque sí es evidente una caída de niveles circulantes significativa que es máxima en condiciones de ayuno y en menor grado en condiciones de alimentación normal. (HERRERA JUSTINIANO, DIAZ GALVEZ, SENDON PEREZ y AZNAR REIG) (63).

El valor medio encontrado por nosotros en el presente estudio en el grupo de adultos sanos fué de $9,07 \pm 3,84 \mu\text{gr/ml}$, es decir, cifras perfectamente concordantes con las ya descritas, si bien nuestros valores individuales fueron algo más dispersos. En parte, ello puede deberse a la mayor casuística barajada (33 casos frente a 12).

Hemos encontrado en la literatura mundial consultada, escasos trabajos que se ocupen de la relación entre hígado y actividad de Somatomedina A, medida ésta, en general, utilizando como índice de actividad la incorporación a distintos tipos de cartilago de un substrato marcado. Ello ha permitido postular que el hígado es, tal vez, el principal órgano generador de actividad SM-A, aunque también en otros tejidos se ha podido comprobar.

Sin embargo, siendo la SM-B, como cabe suponer por los estudios aportados hasta la fecha, un péptido también relacionado con la hormona de crecimiento, nada sabemos sobre su lugar -

de producción. El hecho de que su actividad biológica conocida se ejerza sobre células de la glia y sobre fibroblastos de pulmón de embrión humano hace que el conocimiento de sus propiedades biológicas sea muy engorroso y difícil. No obstante, cuenta con la ventaja de la posibilidad de su determinación directa en plasma. La relación entre ambos parámetros no se podrá establecer hasta que se estudien paralelamente los niveles plasmáticos junto a la actividad biológica. Estas dificultades quizás expliquen que hasta el momento no se hayan publicado datos referentes a su probable lugar de origen, significado biológico, etc.

Así la situación, aunque no tenemos datos que lo confirmen, cabe suponer que el hígado, por la sola razón de ser el órgano metabólicamente más activo del organismo, lugar de asiento de multitud de procesos de formación, depuración y transformaciones bioquímicas, pueda también jugar un papel decisivo en la generación de SM-B. Si a partir de la hormona de crecimiento tiene la capacidad de generar SM-A, nada tendría de extraño que también favoreciera los procesos anabólicos y regenerativos de otros tejidos generando otra sustancia trófica como la somatomedina B.

Hechas estas consideraciones, los resultados obtenidos de nuestro trabajo serán comparados o relacionados con las aporg

taciones conocidas con respecto a la SM-A, aún sabiendo que no se pueden extrapolar los hallazgos de actividad biológica de SM-A a los niveles circulantes de SM-B.

Como ya expusimos en el capítulo de resultados, nuestros hallazgos confirman que en el paciente cirrótico existen niveles circulantes de SM-B significativamente más bajos que los encontrados en sujetos adultos sanos, lo cual viene a apoyar nuestra suposición apriorística de que, también en el caso de la generación de SM-B, el hígado juega un papel importante.

Estudiando actividad de somatomedina como factor de sulfatación en un conjunto de pacientes con enfermedad hepática crónica, WU y cols. en 1974 encontraron valores bajos con relación a un "pool" de suero procedente de un grupo de individuos sanos; en general, los valores más bajos fueron encontrados en aquellos pacientes con una insuficiencia hepática más manifiesta, según datos clínicos y bioquímicos de función hepática (60). Asimismo, MAREK, SCHULLEROVA y SCHREIBEROVA en 1976, comunican un estudio realizado en 9 pacientes con hepatopatías crónicas; en todos ellos, la actividad SM-A plasmática se mostró también inferior respecto al grupo control sin hepatopatía (64). Por su parte, SCHIMPF, LEBREC y DONNADIEU, en una comunicación aparecida muy recientemente (1977), confirman este mismo hallazgo en

su grupo de 18 enfermos cirróticos (65).

En todos estos estudios citados se concluye, a la vista de los resultados, que el hígado debe ser un órgano importante en la generación de SM ya que su fracaso funcional se acompaña de déficit de actividad plasmática.

¿Qué factores son los que condicionan el menor rendimiento hepático en caso de cirrosis?. Entre las numerosas definiciones que se han dado de la cirrosis cabe señalar aquí la propuesta por POPPER, H. y ORR, W. : "Nódulos y tabiques de tejido fibroso que enlazan las áreas portales con los canales centrales". Actualmente, la mayoría de los autores están de acuerdo en que la regeneración nodular del parénquima y la trama de tejido conectivo producen una alteración de la circulación hepática y generalmente, también una reducción de la masa hepatocítica funcional. Poca sangre esplácnica alcanza el hígado, debido a las colaterales porto-sistémicas extrahepáticas; poca sangre de la que llega al hígado alcanza los hepatocitos debido a las anastomosis intrahepáticas entre sistemas vasculares aferentes y eferentes, y el intercambio entre la sangre de los sinusoides y los hepatocitos se halla dificultado debido al excesivo número de células sinusoidales y a la anormalidad de las membranas basales que separan los sinusoides de las células hepáticas. Por consiguiente, los aspectos histológicos y funcionales se imbr-

can y alteran en distinto grado. Por una parte hay fracaso de los sistemas celulares, hepatocito y sistema reticulohistiocitario (S.R.H.) cuyo representante es la célula de KUPFFER, y por otra, afectación de la circulación por la formación de "shunts" arteriovenosos. Las características patológicas peculiares de cada caso irán en función de la etiología, patogénesis, idiosincrasia individual, etc.

En el presente trabajo, los parámetros de función hepática estudiados y relacionados con los niveles de SM-B han sido clasificados según la significación fisiopatológica que tienen con el fin intentar ver si los menores niveles de somatomedina B encontrados reflejan, predominantemente, un fracaso del hepatocito o, más bien, vienen condicionados por la disminución de perfusión efectiva del parénquima noble. Así, hemos analizado la correlación existente entre dichos niveles de SM-B inmuno--rreactiva, de una parte, con las pruebas biológicas que refle--jan la actividad de síntesis de enzimas y proteínas ligadas al hepatocito; con sustancias normalmente metabolizadas y/o depuradas por el hígado y que son retenidas en su fracaso, fisiológicas unas y extrañas al organismo otras; con el patrón disproteimémico que señala el síndrome biológico inflamatorio; con enzimas intracelulares que reflejan el daño del hepatocito en sí o de su membrana; y de otra, con la mayor o menor afectación de la circulación hepática en su conjunto.

No hemos encontrado ninguna relación en nuestro estudio entre niveles de SM-B y los de Proteínas Totales, Albúmina, Gammaglobulina y cociente Albúmina/Gamma, tanto en valores absolutos como porcentuales.

Igual resultado obtuvo SCHIMPF y cols. (1977) al relacionar la cifra absoluta de albúmina con la de actividad de SM-A en su serie de 18 enfermos cirróticos (65). Sin embargo, en otras series estudiadas se comunican correlaciones positivas, incluso con alto grado de significatividad (64) (60). Hay que hacer constar que algunas de estas series estudian un reducido número de casos. No obstante, en un trabajo publicado en fecha muy reciente por TAKANO, HIZUKA, SHIZUME, HAYASHI, MOTOIKE y OBATA (1977) sobre un numeroso grupo de enfermos con insuficiencia hepática (53 casos entre cirrosis y hepatitis crónica), también se encontró una significativa correlación entre las cifras de albúmina y SM-A medida por análisis sobre radioreceptores utilizando membranas de placenta humana (67).

La existencia de proteínas transportadoras para la somatomedina es bien conocida (19) aunque estas proteínas no han sido bien tipificadas. Ha sido comprobado, al determinar simultáneamente la somatomedina libre y ligada, que la disminución de proteína transportadora puede resultar en la disminución del nivel plas

mático total de somatomedina (HALL, TAKANO, ENBERG y FRYKLUND) - (68). No obstante, ningún trabajo en relación a la cantidad de SM ligada en enfermedades hepáticas ha sido publicado hasta la fecha.

Por otra parte, la unión de las somatomedinas a las -- proteínas plasmáticas, basados en las investigaciones realizadas al respecto, parece que difieren notablemente. La SM-A se encuentra ligada a proteínas de tamaño próximo a la albúmina y que evitan su rápida degradación (BRANDE y WEAVER, 1971) (69), mientras que en el caso de la SM-B ésta proteína tiene un tamaño parecido al de una globulina gamma aunque su movilidad electroforética en papel (que sólo depende de la carga) sea la de una globulina alfa. Como antes se dijo, tampoco encontramos en el paciente cirrótico, generalmente con una hipergammaglobulinemia, ninguna relación entre ésta fracción y los niveles de SM-B inmunorreactiva circulantes.

Para MAREK y cols. (64), la menor actividad SM-A en el plasma del enfermo cirrótico con relación al normal podría explicarse por la insuficiente formación de la correspondiente proteína transportadora. Por el momento, estos hallazgos señalados en la literatura junto a los nuestros formarán parte de un bagaje de conocimientos del fenómeno en sí, en espera de que las futuras investigaciones lo expliquen definitivamente.

La experiencia clínica reconoce ciertos trastornos de la coagulación como fiel testigo de enfermedad hepática. En condiciones fisiológicas, el hígado elimina de la circulación los activadores del plasminógeno; en las lesiones parenquimatosas graves y difusas se inactivan insuficientemente los activadores del plasminógeno circulantes, lo que tiene como consecuencia un aumento en la producción de plasmina. Asimismo, la célula hepática es el origen exclusivo de todos los factores plasmáticos de la coagulación, con la sola excepción del factor VIII. Esto explica que el hígado sea el órgano principal para el mantenimiento de la hemostasia. La cuantía del descenso de los factores de coagulación refleja el grado de lesión celular, si bien, en el caso de la cirrosis hepática es prácticamente imposible delimitar en qué medida esta lesión celular es primaria o secundaria a la hipoxia que la disminución de perfusión eficaz acarrea.

El tiempo de protrombina de Quick evalúa los factores II, V, VII, IX y X. En nuestra serie estudiada se encontró un grado de correlación positivo y estadísticamente significativo entre el tiempo de protrombina expresado en porcentaje y los niveles circulantes de SM-B.

Es sabido que en la hepatitis crónica y la cirrosis hepática, mientras los factores II, VII, IX y X están casi invariablemente disminuidos, los factores I (fibrinógeno) y V (proacele-

rina) permanecen normales durante largo tiempo. Por otra parte, el déficit de vitamina K se suma en el cirrótico con frecuencia como factor de desequilibrio hemostático; los factores dependientes de ella son el II, VII, IX y X (RAPAPORT) (70), precisamente los más deprimidos en ausencia de tratamiento. Esto tal vez explique que hayamos encontrado correlación significativa con el tiempo de protromбина pero no con la cifra de fibrinógeno, en general, menos - afectado.

Sólo podemos contrastar éste hallazgo con SCHIMPFF, R. M. y cols. (65), que no encontró relación entre el tiempo de protromбина y la actividad SM-A, y con la recientísima aportación de TAKANO, K. y cols. (67) que, por el contrario, constató una alta correlación positiva entre el T.P. y actividad SM-A en el trabajo antes mencionado. Estos últimos autores encontraron esta correlación, en general, con todos los parámetros testados como específicos de fracaso parenquimatoso en la cirrosis (Albúmina, Colesterol total y Colinesterasa). Nosotros no hemos encontrado tampoco ninguna relación entre niveles de SM-B y colinesterasa.

Igual resultado negativo obtuvimos en lo referente a bilirrubina y fosfatasas alcalinas. En las series estudiadas con respecto a actividad SM-A por SCHIMPFF, R.M. y cols. (65) y MAREK, J. y cols. (64), tampoco pudieron establecer correlación con es---

tos parámetros. Sin embargo, WU y cols. (60) sí que obtuvieron -- con ambos una significativa correlación negativa, indicando que a mayor grado de afectación hepática existía una menor actividad sérica de SM-A. Las fosfatasas alcalinas tienen un valor relativo -- en el diagnóstico químico-biológico ya que engloba varias isoenzimas que no comparten igual especificidad de órgano; no obstante, -- consideradas sólo en individuos adultos no gestantes y sin enfermedad ósea primaria se descartan fluctuaciones atribuibles a -- otros fenómenos fisiopatológicos que tienen que ver muy directamente con el nivel de fosfatasa alcalina. Desde luego, ni la bilirrubina sérica ni la fosfatasa alcalina son índices fidedignos -- del estado evolutivo de la cirrosis y tienen grandes fluctuaciones en poco tiempo si se le sigue en un mismo individuo.

Hay unanimidad de hallazgos entre los autores que estudiaron la posible relación existente entre actividad SM-A y niveles de transaminasas (SCHIMPF, R.M. y cols., MAREK, J. y cols., TAKANO, K. y cols.). Ninguno de ellos encontró correlación entre la diátesis enzimática, que se acepta como reflejo de necrosis celular y/o alteración de la permeabilidad de membrana y la actividad SM-A. Tampoco nosotros la hemos obtenido para éstos enzimas -- ni para LDH con la SM-B. El hígado, como el músculo estriado y la piel, tiene mucha isoenzima LDH beta-gamma; pero la hepatitis y la necrosis hepática sólo producen aumentos muy pequeños de acti-

vidad LDH en suero. La explicación de este hecho podría ser que - las isoenzimas LDH parecen estar unidas a las plaquetas en forma inactiva (COHEN y LARSON, 1966) (71). Es un índice, por consiguiente, poco sensible de enfermedad hepática.

De particular interés nos parecen los resultados encontrados al relacionar los niveles circulantes de SM-B con índices de función hepática y flujo sanguíneo circulante.

El avance actual de las técnicas radioisotópicas permite hoy, por métodos incruentos y sencillos, obtener una evaluación bastante aproximada del grado de afectación, tanto de la función hepática como de su estado hemodinámico. Pensamos que con la técnica seguida de aclaramiento fraccional de Rosa de Bengala y oro coloidal se exploran simultáneamente los dos sistemas celulares - que reflejan, por una parte, el estado funcional global del hepatocito, aunque sea de manera inespecífica ("clearance" parenquimatoso del Rosa de Bengala), y por otra, las condiciones hemodinámicas ("clearance" kupfferiano de partículas mayores tales como el oro coloidal). Utilizando estos dos trazadores simultáneamente, - tal como preconizaron VETTER, FALKNER y NEUMAYR (72) y calculando las curvas de aclaramiento por detección externa sobre la región temporo-parietal izquierda del paciente (NORDYKE y BLAHD) se puede distinguir, dentro de ciertos límites, entre el componente de

fracaso propiamente celular y afectación de perfusión hepática -- (73).

En nuestros pacientes, la correlación obtenida entre niveles de SM-B y aclaramiento fraccional de Rosa de Bengala muestra un paralelismo entre daño parenquimatoso y niveles circulantes de dicha somatomedina. A similares resultados llegaron TAKANO y cols. (67) cuando relacionaron los niveles de SM-A y la depuración de verde Indocianina en su grupo.

Esta relación directa alcanzó aún mayor grado entre SM-B inmunorreactiva y flujo sanguíneo circulante portal en nuestro grupo de pacientes. Este hallazgo concuerda con los trabajos recientes de SCHIMPF y cols. (65) que, midiendo el flujo hepático real en pacientes cirróticos tras cateterización de la vena hepática, encuentra también una correlación positiva y significativa entre producción de actividad SM-A y flujo sanguíneo hepático. En un trabajo previo (61) realizado en un grupo de perros normales, demostraron que no había diferencia significativa de actividad SM-A entre las muestras tomadas de la vena porta y una vena periférica.

Hay evidencias experimentales y observaciones clínicas que sugieren que la insulina puede estimular la generación de somatomedina por parte del hígado. En efecto, hígados de rata per-

fundidos con cantidades de insulina y GH insuficientes por sí mismas para incrementar la liberación de somatomedina de forma significativa, liberan mucha mayor cantidad cuando ambas concentraciones insuficientes se infunden juntas, lo cual pone de manifiesto el efecto agonista de estas hormonas sobre el hígado (DAUGHADAY, PHILLIPS Y MUELLER, 1976) (74). Asimismo, se conoce el hecho de que niños con talla baja operados de un craneofaringioma muestran un crecimiento, incluso acelerado, a pesar de los niveles muy bajos de GH. Este fenómeno se atribuye al hiperinsulinismo que aparece con la hiperfagia que desarrollan tras la intervención (COSTIN, KOGUT, PHILLIPS y DAUGHADAY, 1976; KENNY, GUYDA, WRIGHT y FRIESEN, 1973) (75) (76). Es posible que la insulina pueda aumentar la generación de somatomedina en presencia de mínimas cantidades de GH, aunque la insulina por sí misma, en ausencia de hormona de crecimiento, pueda promover el crecimiento (LAWRENCE, SALTER y BEST, 1954; SALTER y BEST, 1953) (77) (78) (35).

Estos conocimientos aplicables a la SM-A nos movieron a estudiar si existía alguna relación entre insulina y niveles circulantes de SM-B en el enfermo cirrótico que, como han mostrado diversos autores (COLLINS, LACY, ATIEL y CROFFORD, 1970; SAMAN, STONE, y ECKHARDT, 1969; HERRERA JUSTINIANO, 1972; JOHNSTON, ALBERTI, FABER, BINDER y WRIGHT, 1977; etc.) muestra un hiperinsulinismo, en parte ineficaz. (79) (80) (81) (82)

Efectivamente, los valores medios de insulinemia basal encontrados en nuestra población cirrótica son elevados y no se correlacionan significativamente con los niveles de SM-B. No conocemos otros estudios que hayan relacionado éstos dos parámetros. Si para la SM-B la insulina también ejerce un efecto sinérgico -- con la hormona de crecimiento y lo que falla es el órgano efector, en nuestro caso el hígado, es un punto aún por aclarar.

De la misma forma, un dato muy constante en la constelación hormonal del cirrótico es un aumento de estrógenos. En estos enfermos la conversión periférica de androstenediona en estrona y de testosterona en estradiol está incrementada de dos a cinco veces (ADLERCREUTZ, 1974) (83). A éste respecto, los pacientes acromegálicos tratados con estrógenos han mostrado disminución de su elevada actividad SM-A, efecto que ha sido utilizado como terapéutica complementaria a la irradiación o la cirugía para inhibir el crecimiento (WIEDEMANN y SCHWARTZ, 1972) (84). Efecto similar se ha podido observar en individuos normales que reciben grandes dosis de estrógenos (WIEDEMANN, SCHWARTZ y FRANTZ, 1976) (85). Se ha discutido si este efecto era debido a la inhibición de liberación de GH o a la acción periférica del esteroide, provocando una menor producción de somatomedina. Después de haber comprobado éste efecto inhibitor en pacientes tratados simultáneamente con es-

trógenos y GH exógena, así como la ineficacia de los estrógenos - sobre el cartilago in vitro, se admite que su acción se ejerce in hibiendo la producción del factor con actividad somatomedina.

Entre los autores que se han ocupado de estudiar activi dad SM-A en el cirrótico, todos encuentran una disminución rele-- vante respecto al individuo sano pero ninguno ha relacionado este hallazgo con los niveles de estrógenos circulantes, que deben de aumentar tambien en proporción al daño hepático.

Con respecto a la SM-B, nosotros no hemos hallado una - correlación significativa entre ambos parámetros en los 25 enfer- mos varones estudiados en éste sentido.

Pensamos que, en el contexto de este trabajo, un aspec- to especialmente interesante ha sido el estudio de la relación en tre SM-B y hormona de crecimiento en la insuficiencia hepática -- crónica, tanto en situación estática como dinámica. Como ya men-- cionamos en el capítulo de resultados, se encontró una correla- -- ción inversa y estadísticamente significativa entre ambas.

Los valores basales relativamente altos de hGH en nues- tro grupo de pacientes son acordes con las observaciones previas de otros autores. HERNANDEZ, ZORRILLA y GERSHBERG, 1969; BECK, -- PARKER y DAUGHADAY, 1966; CONN y DAUGHADAY, 1970; ZANOBONI y ZANO BONI-MUCIACCIA, 1977; HERRERA JUSTINIANO, 1972; SAMAN y cols., -

1969; entre otros, han encontrado altos niveles basales de GH en el enfermo cirrótico (86) (87) (88) (89) (81) (80), STOCKS y POWELL, 1972, demostraron una exagerada respuesta de hGH a la hipoglucemia (90). Aún no tenemos una explicación satisfactoria que explique el porqué de estas concentraciones anormales a pesar de que numerosos investigadores se han ocupado del tema y gracias a éllo sabemos hoy que la tasa de aclaramiento metabólico está reducida en estos enfermos (OWENS, SRIVASTAVA, TOMPKINS, NABARRO y SONKSEN, 1973) (91). Asimismo, hay evidencias clínicas y experimentales de que los estrógenos facilitan la liberación de GH. MERIMEE, RABINOWITZ, BIGGS, BURGUES, RIMOIN y MCKUSICK en 1967, -- apreciaron mayor liberación de GH tras perfusión de arginina en mujeres que en hombres de la misma edad (92). También se ha demostrado (FRATZ y RABKIN, 1965) que los estrógenos aumentan la liberación de GH durante la hipoglucemia insulín-inducida (93) y la sola administración de dietilestilbestrol por vía oral en el niño es capaz de provocar una significativa liberación de esta hormona (BACON, LOWERY y KNOLLER, 1969) (94); aunque la respuesta no es tan constante como con otros estímulos.

Altos niveles de GH con baja actividad SM-A han sido -- descritos en otras situaciones. Así, en niños tratados con corticoides la actividad SM-A es reducida mientras que la secreción de GH es normal, a pesar de que en el adulto las dosis farmacoló

gicas de corticoides reducen significativamente la tasa de producción (95). Las experiencias señalan que los corticoides disminuyen la generación de somatomedina y puede inhibir la acción de ésta sobre el cartílago (ELDERS, WINGFIELD, McNATT, CLARKE y HUGHES, 1975) (96).

En 1972, PIMSTONE, BECKER y HANSEN informaron de los altos niveles plasmáticos de GH encontrados en niños con severa mal nutrición proteica. Posteriormente encontraron una fuerte correlación inversa entre niveles de GH y las concentraciones de leucina, insoleucina, valina y alanina (97). También en el paciente cirrótico, sobre todo estudiado en una fase de descompensación que motiva su ingreso hospitalario, juega un papel este factor de desnutrición y en estas circunstancias también hay observaciones de disminución de los niveles de valina, leucina e isoleucina (81). Conocida es también la importancia de los aminoácidos con rela-ción a la actividad SM-A (SALMON, 1960).

Así pues, hechas estas consideraciones quizá podamos, no sólo enunciar nuestros hallazgos, sino situarlos dentro de unas coordenadas que le den sentido.

La metodología experimental seguida en nuestro grupo de enfermos descartan factores que pueden falsear a la hora de interpretar los valores de hGH, tales como stress, interferencias far-

macológicas, etc.

Los distintos autores que estudiaron la relación entre hormona de crecimiento y actividad SM-A, también encontraron sistemáticamente una tendencia a niveles altos de aquélla en circunstancias basales. Pero los resultados son dispares en lo referente a la correlación entre ambas, de modo que, mientras MAREK y cols. (64) y SCHIMPF y cols. (65) obtienen un bajo grado de correlación, WU y cols. (60), valorando la actividad SM-A sobre cartilago de embrión de pollo y TAKANO y cols (67) con análisis de radioreceptor sobre membrana de placenta humana, encuentran una correlación inversa estadísticamente significativa entre ellas. Estos resultados son similares a los nuestros con respecto a la SM-B.

A la luz de los conocimientos actuales caben algunas interpretaciones de éstos hallazgos que plantean otras tantas interrogantes. En primer lugar, admitiendo la dependencia fisiológica existente entre GH y SM-B, habría que explicar qué es lo primero en la relación paradójica entre ellas en la cirrosis. No parece lógico pensar que los elevados niveles de hGH sean la causa, por sí misma, de la menor cantidad de SM-B detectada en estos enfermos. Los datos acumulados hasta la fecha apuntan precisamente en contra de ello, ya que el tratamiento de ratas hipofisectomizadas

con hormona de crecimiento exógena restituye la capacidad del plasma para la incorporación de timidina en las células gliales (49) y, por el momento, no hay fundamentos para pensar que en la cirrosis la GH tenga un efecto contrario. Más lógico parece pensar que los menores niveles circulantes de SM-B, dada esta correlación inversa, es uno más de los factores que explican las mayores concentraciones de hormona de crecimiento en la insuficiencia hepática crónica, haciendo valedera la hipótesis de servomecanismo entre ambos factores de igual modo que TANNER (1972) sugirió para SM-A (99).

En segundo lugar, ¿qué justifica esta caída de los niveles de SM-B inmunoreactiva en el cirrótico? Si la diferencia de medias entre población sana y enferma es significativa, parece claro que existe una relación entre hígado y SM-B, ya que lo que diferencia a ambas poblaciones es, precisamente, la indemnidad o patología hepática. Dentro de esta patología se manifiestan relacionados con los niveles de SM-B, por una parte, parámetros de función parenquimatosa (Tiempo de protrombina, aclaramiento fraccional de Rosa de Bengala) y, por otra, parámetros indicativos del estado de irrigación de la glándula (Flujo sanguíneo circulante portal).

De forma similar al concepto establecido concerniente a la relación hígado-somatomedina A, nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de que el hígado, efectivamente, parece ser un órgano importante en la generación de SM-B y que los menores niveles circulantes encontrados en el enfermo cirrótico, vienen condicionados por el fracaso funcional hepático, jugando un papel relativamente mayor la alteración hemodinámica que el propio daño parenquimatoso.

Tampoco podemos olvidar la contribución de otros posibles factores como:

- Disminución de síntesis de proteína transportadora, - que en nuestro caso creemos poco probable, ya que no encontramos relación entre los niveles de las distintas proteínas con las de SM-B inmunorreactiva. A este respecto, también cabe pensar que - la afinidad entre la hormona y la proteína transportadora cambie de forma sustancial, de tal manera que, aunque se detecte menor nivel circulante, tenga mayor actividad biológica. Este punto, - aunque posible, no podemos aceptarlo si admitimos el "feed-back" con la GH ya que en tal caso no se elevarían los niveles de esta hormona.

- Presencia de factores inhibidores (GRANT, HAMBLE, -- BECKER y PIMSTONE, 1973). En nuestro caso sólo cabe considerar - los inhibidores de generación o liberación de SM-B y no los inhibidores de su actividad biológica, al utilizar un método de RIA.

(100).

- Disminución del número de receptores en las células de aquellos órganos capaces de generar la SM-B bajo estímulo de la GH. Así como para SM-A, NSILA-S, Insulina y SM-C existen diversos tejidos conocidos donde se demuestran receptores de membrana, en ninguno de los tejidos de rata y mono investigados por TAKANO y cols. (45) se encontró unión de SM-B a las membranas, incluyendo el hígado. Este punto permanece aún oscuro; no se sabe si el proceso de yodación necesario para detectar la hormona marcada puede destruir su capacidad de unión a la membrana. Esto explica que no se haya desarrollado todavía un método de análisis de radioceptores como existen para las otras somatomedinas.

- Disminución de sustancias agonistas o favorecedoras de la síntesis de SM-B. Hemos mencionado ciertos cambios en los niveles de algunos aminoácidos esenciales en la malnutrición severa y en la cirrosis. No sabemos si estos desequilibrios homeostáticos inherentes a la enfermedad hepática crónica pueden alterar la generación de SM-B en presencia de GH.

- Tal vez el metabolismo alterado de los esteroides, con el consiguiente aumento en las concentraciones de estrógenos, juegue un importante papel en los mayores niveles basales de hGH en el enfermo cirrótico (93) (94). En cuanto a niveles circulan

tes de SM-B, no hemos encontrado correlación significativa con las cifras de estradiol como ya habíamos comentado.

- Mayor aclaramiento metabólico. No se han realizado trabajos a este respecto a pesar de disponerse hoy del radioinmunoanálisis para SM-B en orina. De todas formas, como luego exponemos, viendo el comportamiento dinámico de los niveles de SM-B durante 5 horas, existe una rápida tendencia a la caída de niveles circulantes a pesar de mantenerse los de hGH. Si ésto es índice de un mayor aclaramiento o el reflejo de variaciones circadianas en el cirrótico es algo todavía desconocido.

- Efecto de dilución. Los cambios circulatorios en la cirrosis se parecen mucho a los encontrados durante el embarazo. El volumen de sangre se incrementa. EISENBERG en 1956 observó un incremento en el volumen del plasma en los pacientes con varices esofágicas y un incremento adicional de la masa de hemafes en los pacientes que también tenían cianosis periférica. (101). De todas formas, el mismo efecto de dilución y en igual medida afecta a la hormona de crecimiento, lo cual invalida esta posibilidad, ya que la correlación entre hGH y SM-B es negativa.

- Mayor consumo. Esta hipótesis es muy sugestiva. El fibroblasto se considera convencionalmente la célula productora de la sustancia escleroproteica y de la matriz del colágeno. La

fibrosis es una característica anatomopatológica de la cirrosis hepática. Para que el fibroblasto del hígado comience a formar colágeno deberá sufrir previamente un proceso de desdiferenciación (fibrocito \rightarrow fibroblasto), como toda célula metabólicamente activa y con facilidad reproductora. La condición de ésta desdiferenciación implica pluripotencialidad en sus funciones (que es una característica muy propia de las células del tejido conectivo), y ello le asemeja a las células embrionarias, como el fibroblasto de pulmón embrionario, que muestra actividad frente a la SM-B. No se han encontrado receptores para SM-B en el hígado pero sería interesante ver si existen en los fibroblastos de estas hepatopatías esclerosantes. La desdiferenciación implica de-represión genética para asumir funciones nuevas. Sabemos que otras células, incluyendo células epiteliales y tumorales, son capaces de producir colágeno en cultivos hísticos (LANGNES y UDENFRIEND, 1974) (102). Así pues, se ha postulado que la de-represión de genes preformados puede inducir en muchas células la formación de colágeno.

Estudios sobre la arteriosclerosis se han centrado sobre el papel de las células del músculo liso, y algunos experimentos han demostrado (IRLE, RYAN, BABBIANI y MAJNO, 1974) miofibroblastos en el hígado cirrótico, que pueden ser los responsables de la formación de fibras y de la retracción de la cicatriza

ción en la cirrosis (103). El mecanismo de estimulación y regulación de las células formadoras de fibras se desconoce. La tensión baja de oxígeno puede ser un factor. La presencia frecuente de células inflamatorias en el tejido conectivo fibrosante hepático sugiere que los linfocitos, los macrófagos o ambos, desempeñan un papel, por lo menos proporcionando una señal. Los linfocitos de pacientes con enfermedad hepática crónica estimulados por hígado autólogo, liberan un factor estimulante de los fibroblastos (CHEN, ZETTERMAN y LEEVY, 1973) (104). También se ha comunicado el aumento del crecimiento de los fibroblastos hepáticos en cultivos hísticos de pacientes con enfermedad hepática. Mediante técnicas histoquímicas y por determinación química se ha demostrado en el hombre y en animales de experimentación un contenido elevado de proteoglicósidos en las lesiones activamente fibrosantes, y en la sangre se han encontrado cantidades excesivas de estas sustancias; sin embargo, estas determinaciones no han adquirido utilidad clínica diagnóstica (POPPER y BECKER, 1975) (105). Por otra parte, el hecho de que la actividad SM-A disminuya después de la hepatectomía parcial podría también interpretarse de modo que apoye esta hipótesis. La regeneración hepática es un fenómeno biológico parcialmente conocido y aún mal explicado. Sabemos que es una regeneración rápida y de una gran actividad hasta volver a lograrse una masa hepática "crítica" y ello, a pesar de --

que un 20% del parénquima de un hígado sano puede asumir todas las funciones sin que se ponga de manifiesto un síndrome biológico de insuficiencia. De este modo, los menores niveles de SM-A podrían interpretarse como mayor consumo (in situ) para conseguir la regeneración, sin perjuicio de que actuaran otras sustancias inductoras del crecimiento.

Basados en el dato conocido de los altos valores basales de GH en los pacientes cirróticos (89) y su respuesta paradójica ante las elevaciones de la glucemia (86) (80) (87), vimos en ello un modelo experimental doblemente útil al brindarnos la oportunidad de estudiar la relación entre somatomedina B y hormona de crecimiento, no sólo en situación estática sino también dinámica, induciendo de manera fácil y poco molesta para el enfermo una elevación endógena de hGH y seguir durante cinco horas el comportamiento de dos factores que, fisiológicamente, parecen estar relacionados.

Según vimos en el capítulo de resultados, a lo largo del tiempo controlado, los valores de SM-B tienden a descender mientras que la hGH muestra mucha mayor irregularidad, pero dentro de las grandes oscilaciones individuales tiende a elevarse precozmente, con niveles medios superiores al valor basal a partir de la primera hora, siendo esta respuesta contraria a lo ob-

servado en el sujeto sano tras la sobrecarga oral de glucosa. El incremento máximo se observó a las tres horas.

Parece haber una discordancia entre los hallazgos comunicados hasta la fecha según se refieran a actividad biológica o a niveles circulantes de SM-B. En efecto, mientras WASTESON y cols. (49) encontraron que el suero de la rata hipofisectomizada tenía escasa capacidad para estimular la incorporación de timidina a las células gliales y que ello se podía restituir a las 4-5 horas de la inyección exógena de GH, YALOW y cols. (48) no detectaron cambios inmediatos en los niveles circulantes de SM-B inmunorreactiva tras la hipoglucemia insulín-inducida o la infusión de arginina, a pesar de los grandes incrementos de hGH en individuos sanos.

Nuestros resultados apuntan también en el sentido de que, a semejanza de lo observado en el sujeto normal (63), los niveles circulantes de SM-B en el paciente cirrótico tiene variaciones circadianas con tendencia a la caída durante las primeras horas de la mañana. Esta tendencia no se ve influida por los niveles, relativamente altos en esta población, de hGH. Admitiendo nuestra anterior hipótesis de la relación-somatomedina B, parece como si el hígado no tuviese reserva funcional y los niveles encontrados fuesen el reflejo de la máxima capacidad genera-

dora ante el estímulo mantenido de la hormona de crecimiento. De todas formas, hay que tener en cuenta también que la dinámica -- funcional es muy diferente, de manera que mientras la hGH se libera y cae con gran rapidez, mostrándose muy lábil, las somatomedinas tienen una acción más sostenida y unos niveles circulantes más constantes.

C O N C L U S I O N E S

Se han estudiado los niveles circulantes basales de SM-B en una población de enfermos con insuficiencia hepática crónica y en un conjunto de sujetos adultos sanos.

Una vez establecida la diferencia entre ambos grupos se analizaron diversos parámetros característicos de la enfermedad con el fin de determinar si existía algún tipo de relación con los niveles de SM-B inmunorreactiva. Los parámetros hepáticos fueron seleccionados y clasificados de tal forma que, en el caso de encontrar resultados positivos, se pudieran encuadrar como principalmente dependientes de:

- a) Afectación parenquimatosa hepática
- b) Afectación de las condiciones hemodinámicas
- c) Constelación hormonal del paciente cirrótico.

Esto, con las limitaciones que supone una clasificación rígida que sólo sirve de guía o directriz para el proceso analítico. El desarrollo del presente estudio nos permite establecer las siguientes conclusiones:

- 1) Los niveles medios circulantes de SM-B inmunorreactiva en situación basal, en la población de los 42 enfermos cirróticos estudiados, fueron significativamente meno--

res que en los sujetos adultos sanos.

- 2) Al relacionar los niveles circulantes de SM-B con las distintas fracciones del proteinograma, no se obtuvo correlación significativa.
- 3) Se obtuvo una correlación positiva y significativa entre niveles circulantes de SM-B y el tiempo de protrombina pero no para con la tasa de fibrinógeno. Interpretamos este hecho como algo que liga de forma directa los niveles de SM-B a una función esencialmente hepática en cuanto reflejo de capacidad funcional de parénquima noble. La falta de correlación con la tasa de fibrinógeno se puede explicar por la mayor resistencia de éste a su descenso, incluso en la insuficiencia hepática crónica. Los factores que muestran correlación con los niveles de SM-B son los dependientes de la acción de la vitamina K sobre el hígado: II, VII, IX y X.
- 4) Ausencia de relación entre niveles circulantes de SM-B y otras enzimas y proteínas de síntesis hepática como son la albúmina y la colinesterasa.
- 5) Tampoco encontramos relación entre SM-B y niveles sanguíneos de sustancias fisiológicamente eliminadas por

la bilis y patológicamente retenidas en la insuficien--
cia hepática, como son la bilirrubina y las fosfatasas
alcalinas.

- 6) Se obtuvo una significativa correlación positiva entre niveles de SM-B circulantes y la valoración funcional hepática mediante capacidad de aclaramiento "parenquimatoso" utilizando como trazador Rosa de Bengala I¹³¹
- 7) Un mayor grado de correlación se obtuvo entre los niveles de SM-B circulante en el cirrótico y la valoración de la perfusión hepática eficaz estudiada ésta mediante técnica radioisotópica que utiliza como trazador una -- partícula coloidal marcada (Au¹⁹⁸ coloidal)
- 8) Falta de correlación significativa entre los niveles -- circulantes de SM-B y otras hormonas muy relacionadas fisiológicamente con otras somatomedinas, tales como la insulina y el estradiol, cuyas diferencias de concentración plasmática en el cirrótico con respecto al individuo normal son claras. Este hallazgo apoya la idea de la completa independencia estructural y distinto significado fisiológico entre SM-B y el restante grupo de polipéptidos con actividad "somatomedínica".

- 9) Relación inversa, estadísticamente significativa, entre niveles de hormona de crecimiento y SM-B circulantes en situación basal.

- 10) En la prueba dinámica mediante test de sobrecarga oral de glucosa se evidencia un comportamiento disociado entre ambas hormonas "a corto plazo", predominando, en el intervalo de cinco horas estudiado, una clara tendencia a la caída de los niveles circulantes de SM-B como reflejo de variaciones circadianas, a semejanza de lo que ocurre en el individuo sano. Esto, a pesar de la tendencia global de un incremento o, cuando menos, falta de decremento de hGH que se observa en el paciente cirrótico tras la sobrecarga oral de glucosa.

- 11) Como síntesis final de nuestras conclusiones podemos decir que:
 - La insuficiencia hepática crónica parece estar claramente relacionada, en el hombre, con niveles circulantes de SM-B inmunorreactiva significativamente menores que los encontrados en individuos sanos. Esta menor producción y/o liberación, se relaciona con datos funcionales hepáticos expresivos, por una

parte, de afectación parenquimatosa (tiempo de protrombina; aclaramiento fraccional de Rosa de Bengala), y por otra, de déficit de perfusión efectiva del hepatocito (Flujo sanguíneo circulante portal), siendo el grado de correlación con éste parámetro más estrecho que con los anteriores. Ello parece indicar que el principal factor implicado en los menores niveles circulantes de SM-B podría ser la situación de precaria irrigación de la célula noble hepática, aunque también juegue un papel el daño primario del hepatocito.

- La significativa correlación inversa que hemos encontrado en situación basal entre hGH y SM-B en la insuficiencia hepática crónica, permite pensar en la existencia de un control entre ambas por mecanismo de "feed-back". Este servomecanismo se muestra menos rápido y eficaz, tal vez como expresión de una falta de eficacia del órgano supuestamente efector para hGH, en nuestro caso el hígado.

- Parece haber, en el enfermo cirrótico, una fuerte tendencia a la caída de niveles de SM-B circulantes durante las primeras horas de la mañana, como expre

si6n del mismo ritmo circadiano que se observa en los sujetos sanos, a pesar de la inducci6n pasajera de un aumento de hGH end6geno conseguido en virtud de la respuesta parad6jica del enfermo cirr6tico ante la sobrecarga oral de glucosa.

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

- 1.- EVANS, H.M. y LONG, J.A. (1921)
"The effect of the anterior lobe of the hypophysis administered intraperitoneally upon growth, and the maturity and oestrus cycles of the rat"
Anat. Rec. 21, 62
- 2.- SMITH, P.E. (1930)
"Hypophysectomy and replacement therapy in the rat"
Am. J. Anat. 45, 205
- 3.- RUSSEL, J.A. (1955)
"Hypophyseal growth hormone. Nature and action"
Smith, R.W., Goebler O.H. y Long C.N.H. eds p. 261 New York: McGraw
- 4.- GESCHWIND, I.I. y LI, C.H. (1955)
"The tibia test for growth hormone"
The Hypophyseal Growth Hormone, Nature and Actions, (Ed.)
Smith, R.V., Goebler, O.H. y Long, C.N.H. pp. 28-53. New York: McGraw
- 5.- HERBAI, G. (1970)
"Retardation of body growth and inhibition of sulfate incorporation into costal cartilage of the mouse by various natural and synthetic oestrogens and two oestrogen antagonists"
Acta Societatis Medicorum Upsaliensis, 75, 209
- 6.- LI, C.H. y YAMASHIRO, D. (1970)
"The synthesis of a protein possessing growth promoting and lactogenic activities"
J. Am. Chem. Soc. 92, 7608
- 7.- SONENBERG, M., KIKUTANI, M., FREE, C.A., NADLER, A.C. y DELLACHA, J.M. (1968)
"Chemical and biological characterization of clinically active tryptic digest of bovine growth hormone"
Ann. N Y Acad. Sci. 148, 532

- 8.- SWISLOCKI, N.I., SONENBERG, M. y YAMASAKI, N. (1970)
"In vitro metabolic effects of bovine growth hormone fragments in adipose tissue"
Endocrinology 87, 900
- 9.- NIALL, H.D., HOGAN, M.L., TREGGAR, G.W., SEGRE, G.V., HWANG, P y FRIESEN, H. (1973)
"The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones"
Recent. Progr. Horm. Res. 29, 387
- 10.- ENGEL, F.L. y KOSTYO, J.L. (1964)
"The hormones"
G. Pincus, K.V. Thimann y E.B. Astwood eds. Vol 5. p.69.
Academic Press, New York.
- 11.- KORNER, A. (1969)
"The hormonal control of protein synthesis"
Biochem J. 115, 30 p. - 31 p.
- 12.- KOSTYO, J.L. (1968)
"Rapid effects of growth hormone on aminoacid transport and protein synthesis"
Annales of New York Academy of Science, 148, 389
- 13.- SALMON, W.D. y DAUGHADAY, W.H. (1957)
"A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro"
J. Lab. Clin. Med. 49, 825
- 14.- DAUGHADAY, W.H., SALMON, W.D. y ALEXANDER, F. (1958)
"Sulfation factor activity of sera from patients with pituitary disorders"
J. Clin. Endocrinol. 19, 743
- 15.- ALMQVIST, S., IKKOS, D. y LUFT, R. (1961)
"Studies on sulfation factor (SF) activity of human serum. The variation of serum SF with age"
Acta endocr. (Kbh) 36, 566
- 16.- SALMON, W.D. y DU VALL, M.R. (1970)
"A serum fraction with "sulfation factor activity" stimulates in vitro incorporation of leucine and sulfate into protein-polysaccharide complexes, uridine into RNA, and thymidine into DNA of costal cartilage from hypophysectomized rats"
Endocrinology 86, 721

- 17.- DAUGHADAY, W.H. y MARIZ, I.K. (1962)
"Conversion of proline C-14 to labeled hydroxyproline by rat cartilage in vitro: effects of hypophysectomy, growth hormone and cortisol"
J. Lab. Clin. Med. 59, 741
- 18.- DAUGHADAY, W.H. (1971)
"Regulation of skeletal growth by sulfation factor"
Advan. Intern. Med. 17, 237
- 19.- HINTZ, R.L., ORSINI, E.M. y VAN CAMP, M.G. (1974)
"Evidence for a somatomedin binding protein in plasma"
Proc. 56th Annual Endocrine Society Meeting. 1974 (Abstr)
A-71
- 20.- UTHNE, K. (1973)
"Humans somatomedins: purification and some studies on their biological actions"
Acta endocr. (Kbh) 73, 1
- 21.- LIBERTI, J.P. (1975)
"Purification of bovine somatomedin"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1226
- 22.- CHOCHINOV, R.H., I.K. y DAUGHADAY, W.H. (1976)
"Purification of rat serum somatomedin"
Presented at the 58th Annual Endocrine Society Meeting, San Francisco, 1976 (Abstr)
- 23.- FROESCH, E.R., BURGI, H., MULLEN, A., HUMBEL, R.E., JAKOB, A. y LABHART, A. (1967)
"Non-suppressible insulin-like activity of human serum: purification, physiochemical and biological properties and -- its relation to total serum IIA"
Recent. Progr. Horm. Res. 23, 565
- 24.- FROESCH, E.R., SCHLUMPF, U., HEIMANN, R., EIGENMANN, E. y ZAPF, J. (1975)
"NSILA-S, physiologic and pharmacologic significance as an insulin-like hormone and as a growth-promoting hormone"
Adv. Metab. Disord. 8: 237-48

- 25.- MEGYESI, K., KAHN, C.R., ROTH, J., FROESCH, E.R., HUMBEL, R.E., ZAPF, J. y NEVILLE, D.M. (1974)
"Insulin and non-suppressible activity (NSILA-S): Evidence for separate plasma membrane receptor sites"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 307
- 26.- ZAPF, E.R., FROESCH, B., MORELL, G., HASELBACHER, E., RINDERKNECHT, E. y HUMBEL, R.E. (1976)
"Two polypeptides from human serum with cell growth promoting, sulfation, and non-suppressible insulin-like activities (NSILA I and II): biological properties"
Vth International Congress of Endocrinology (Abstract), 397
- 27.- RINDERKNECHT, E. y HUMBEL, R.E.
"Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with non-suppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: Evidence for structural homology with insulin B chain"
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A) Vol. 73, No 12, pp 4379-81, December 1976 Biochemistry
- 28.- FROESCH, E.R., ZAPF, J., MEULI, C., MADER, M., KAUFMANN, V. y MORELL, B. (1975)
"Biological properties of NSILA-S"
Adv. Metab. Disord. 8: 211-36
- 29.- TELL, G.P.S., CUATRECASAS, P., VAN WYK, J.J. y HINTZ, R.L. (1973)
"Somatomedin: inhibition of adenylate cyclase activity in subcellular membranes of various tissues"
Science 180, 312
- 30.- FRYKLUND, L., UTHNE, K. y SIEVERTSSON, H. (1974)
"Identification of two somatomedin A active polypeptides and in vivo effects of a somatomedin A concentrate"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 957
- 31.- HALL, K. y FILIPSSON, R. (1975)
"Correlation between somatomedin A in serum and body height development in healthy children and children with certain growth disturbances"
Acta endocr. (Kbh) 78, 239

- 32.- TAKANO, K., HALL, K., RITZEN, M., ISELIUS, L. y SIEVERTSSON, H. (1976)
"Somatomedin A in human serum determined by radioreceptor assay"
Acta endocr. (Kbh) 82, 449
- 33.- HALL, K., TAKANO, K. y FRYKLUND, L. (1974)
"Radioreceptor assay for somatomedin A"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 973
- 34.- TAKANO, K., HALL, K., FRYKLUND, L., HOLMGREM, A., SIEVERTSSON, H y UTHNE, K. (1975)
"The binding of insulin and somatomedin A to human placental membrane"
Acta endocr. (Kbh) 80, 14
- 35.- PHILLIPS, L.S. y YOUNG, H.S. (1976)
"Nutrition and somatomedin I. Effect of fasting and refeeding on serum somatomedin activity and cartilage growth activity in rats"
Endocrinology 99, 304
- 36.- HERRERA JUSTINIANO, E., DIAZ GALVEZ, M., AZNAR MARTIN, A. y AZNAR REIG, A. (1974)
"Somatomedina"
Ponencia XV Reunion Nacional de la Sociedad Española de Endocrinología.
Lugo. Mayo 1974
- 37.- SALMON, W.D. (1975)
"Interaction of somatomedin and a peptide inhibitor in serum of hypophysectomized and starved, pituitary-intact rats"
Adv. Metab. Disord. 8: 183-202
- 38.- DAUGHADAY, W.H. y REEDER, C. (1966)
"Synchronous activation of DNA synthesis in hypophysectomized rat cartilage by growth hormone"
J. Lab. Clin. Med. 68, 357
- 39.- VAN WYK, J.J., UNDERWOOD, L.E., BASEMAN, J.B. HINTZ, R.L., CLEMMONS, D.R. y MARSHALL, R.N. (1975)
"Explorations of the insulin-like and growth-promoting properties of somatomedin by membrane receptor assays"
Adv. Metab. Disord. 8: 128-50

- 40.- MARSHALL, R.N., UNDERWOOD, L.E., VOINA, S.J., FOUSHEE, D.B. y VAN WYK, J.J. (1974)
"Characterization of the insulin and somatomedin-C receptors in human placental cell membranes"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 283
- 41.- FURLANETTO, R.W., D'ERCOLE, A.J., UNDERWOOD, L.E. y VAN WYK, J.J. (1976)
"A radioimmunoassay for somatomedin C: development, specificity and results"
Vth International Congress of Endocrinology (Abstract), 392
- 42.- D'ERCOLE, A.J., DECEDUE, C.J., FURLANETTO, R.W., UNDERWOOD, L.E. y VAN WYK, J.J. (1977)
"Evidence that somatomedin-C is degraded by the kidney and inhibits insulin degradation"
Endocrinology 101, 577
- 43.- PIERSON, R.V. y TEMIN, H.M. (1972)
"The partial purification from calf serum of a fraction - with multiplication-stimulating activity and with non-suppressible insulin-like activity"
J. Cell Physiol. 79, 319
- 44.- SIEVERTSSON, H., FRYKLUND, L., UTHNE, K., HALL, K. y WESTERMARK, B. (1975)
"Isolation and chemistry of human somatomedins A and B"
Adv. Met. Disord. 8: 47-59
- 45.- TAKANO, K., HALL, K., FRYKLUND, L. y SIEVERTSSON, H. (1976)
"Binding of somatomedins and insulin to plasma membranes - prepared from rat and monkey tissue"
Horm. Metab. Res. 8, 16
- 46.- YALOW, R.S., HALL, K. y LUFT, R. (1975)
"Immunoreactive somatomedin B in urine"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 638
- 47.- BALA, R.M., BLAKELEY, E.D. y SMITH, G.R. (1976)
"Size heterogeneity of human serum somatomedin"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, 1110

- 48.- YALOW, R.S., HALL, K. y LUFT, R. (1975)
"Radioimmunoassay of somatomedin B. Application to clinical and physiologic studies"
J. Clin. Invest. 55, 127
- 49.- WASTESON, A., WESTERMARK, B. y UTHNE, K. (1975)
"Somatomedin A and B: demonstration of the two different somatomedin-like components in human plasma"
Adv. Metab. Disord. 8: 101-14
- 50.- ALMQVIST, S. y FALKHEDEW, T. (1961)
"Studies on sulfation (SF) activity of human serum. Rate of decrease of serum SF after hypophysectomy"
Acta endocr. (Kbh) 37, 315
- 51.- COHEN, K.L. y NISSLEY, S.P. (1976)
"The serum half-life of somatomedin activity: evidence for growth hormone dependence"
Acta endocr. (Kbh) 83, 243
- 52.- WESTERMARK, B. y WASTESON, A. (1975)
"The response of cultured human normal glial cells to growth factors"
Adv. Metab. Disord. 8: 85-100
- 53.- SALMON, W.D. (1972)
"Investigation with a partially purified preparation of serum sulfation factor: lack of specificity for cartilage sulfation"
Growth and Growth Hormone (Ed). Pecile, A y Muller E.E. (1971). Proceedings of the Second International Symposium on Growth Hormone, Milan, 1971. International Congress Series, 244, 180-191
- 54.- UTHNE, K. y UTHNE, T. (1972)
"Influence of liver resection and regeneration on somatomedin (Sulfation Factor) activity in sera from normal and hypophysectomized rats"
Acta endocr. (Kbh) 71, 255
- 55.- MCCONAGHEY, P. y SLEDGE, C.B. (1970)
"Production of sulfation factor by the perfused liver"
Nature 225, 1249

- 56.- McCONAGHEY, P. (1972)
"The production of sulfation factor by rat liver"
J. Endocrinol. 52, 1
- 57.- DAUGHADAY, W.H., PHILLIPS, L.S. y HERINGTON, A.C. (1975)
"Somatomedin generation by perfused livers"
Adv. Metab. Disord. 8: 151-57
- 58.- PHILLIPS, L.S., HERINGTON, A.C., KARL, I.E. and DAUGHADAY, W.H. (1976)
"Comparison of somatomedin activity in perfusates of normal and hypophysectomized rat livers with and without added - - growth hormone"
Endocrinology 98, 606
- 59.- SMITH, J.L. y TEMIN, H.M. (1974)
"Purified multiplication stimulating activity from rat liver cell conditioned medium: comparison of biological activities with calf serum, insulin and somatomedin"
J. Cell. Physiol. 84, 181
- 60.- WU, A., GRANT, D.B., HAMBLEY, J. y LEVI, A.J. (1974)
"Reduced serum somatomedin in patients with chronic liver disease"
Clin. Sci. Molec. Med. 47, 359
- 61.- SCHIMPF, R.M., DONNADIEU, M., GLASINOVIC, J.C., WARNET, J. M. y GIRARD, F. (1976)
"The liver as a source of somatomedin. An in vivo study in the dog"
Acta endocr. (Kbh) 83, 365
- 62.- McCONAGHEY, P. y DEHNEL, J. (1972)
"Preliminary studies of sulfation factor production by rat kidney"
J. Endocrinol. 52, 587
- 63.- HERRERA JUSTINIANO, E., DIAZ GALVEZ, M., SENDON PEREZ, A. y AZNAR REIG, A.
"Plasma levels of somatomedin B in healthy subjects".
Acta endocr. (Kbh) (En preparaci6n)

- 64.- MAREK, J., SCHÜLLEROVA, M. y SCHREIBEROVA, O. (1976)
"Somatomedin in Chronic liver disease"
Rev. Czech. Med. 22, 194
- 65.- SCHIMPF, R.M., D. y DONNADIEU, M. (1977)
"Somatomedin production in normal adults and cirrhotic patients"
Acta endocr. (Kbh) 86, 355
- 66.- POPPER, H. y ORR, W. (1970)
"Current concepts in cirrhosis"
Scand. J. Gastroenterol. 6, 203
- 67.- TAKANO, K., HIZUKA, N., SHIZUME, K., HAYASHI, N., MOTOIKE, Y. y OBATA, H. (1977)
"Serum somatomedin peptides measured by somatomedin A radio receptor assay in chronic liver disease"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 828
- 68.- HALL, K., TAKANO, K., ENBERG, G. y FRYKLUND, L.
(Studies on the regulation of somatomedins A and B"
Pecile, A. y E.E. MÜLLER (eds). Growth Hormone and Related Peptides, ICS series No 381, Excerpta Medica, MAmsterdam, 1976, p.178
- 69.- BRANDE, J.L. y WEAVER, R.P. (1971)
"Further purification and characterization of sulfation factor and timidine factor from acromegalic plasma"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 32, 389
- 70.- RAPAPORT, S.I.
"Trastornos adquiridos del factor de coagulación plasmático y terapéutica anticoagulante"
Introducción a la Hematología. Eds SALVAT, Barcelona 1974 pp 365-82
- 71.- COHEN, K.L. y LARSON, L. (1966)
" Activation of serum lactic dehydrogenase"
New Engl. J. Med. 275, 465
- 72.- VETTER, H., FALKNER, R. y NEUMAYR, A. (1958)
"The disappearance rate of colloidal radiogold from the circulation and its application to the estimation of liver flow in normal and cirrhotic subjects"
J. Clin. Invest. 33, 1594

- 73.- NORDYKE, R.A. y BLAHD, W.H. (1959)
"Blood disappearance of radioactive Rose Bengal. Rapid simple test of liver function"
J. Am. Med. Ass. 170, 1159
- 74.- DAUGHADAY, W.H., PHILLIPS, L.S. y MUELLER, M.C. (1976)
"The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver"
Endocrinology 98, 1214
- 75.- COSTIN, G., KOGUT, M.D., PHILLIPS, L.S. y DAUGHADAY, W.H. (1976)
"Cranipharyngioma: the role of insulin in promoting post-operative growth"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 42, 373
- 76.- KENNY, F.M., GUYDA, H.J., WRIGHT, J.C. y FRIESEN, H.G. (1973)
"Prolactin and somatomedin in hypopituitary patients with "catch-up" growth following operations for canio-pharyngioma"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 378
- 77.- LAWRENCE, R.I.B., SALTER, J.M. y BEST, C.H. (1954)
"Effect of insulin on nitrogen retention in the hypophysectomized rat"
Brit. Med. J. 2, 437
- 78.- SALTER, J.M. y BEST, C.H. (1953)
"Insulin as a growth hormone"
Brit. Med. J. 2, 353
- 79.- COLLINS, J.R., LACY, W.W., ATIEL, J.N. y CROFFORD, D.B. (1970)
"Glucose intolerance and insulin resistance in patients with liver disease"
Arch. Intern. Med. 126, 608
- 80.- SAMAAAN, N.A., STONE, D.B. y ECKHARDT, R.D. (1969)
"Serum glucose, insulin, and growth hormone in chronic hepatic cirrhosis"
Arch. Intern. Med. 124, 149

- 81.- HERRERA JUSTINIANO, E. (1972)
"Actividad insulinica y proinsulinica plasmática en la cirrosis hepática e influencia del cortisol y hormona de crecimiento sobre su insulin-resistencia"
Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Sevilla.
- 82.- JOHNSTON, D.G., ALBERTI, K.G.M.M., FABER, O.K., BINDER, C. y WRIGHT, R. (1977)
"Hyperinsulinism of hepatic cirrhosis: diminished degradation or hypersecretion?"
Lancet, 1, 10
- 83.- ADLERCREUTZ, H. (1974)
"Hepatic metabolism of estrogens in health and disease"
New Engl. J. Med. 290, 1081
- 84.- WIEDEMANN, E. y SCHWARTZ, E. (1972)
"Suppression of growth hormone-dependent human serum sulfation factor by estrogen"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 51
- 85.- WIEDEMANN, E., SCHWARTZ, E. y FRANTZ, A.G. (1976)
"Acute and chronic estrogen effects upon serum somatomedin activity, growth hormone and prolactin in man."
J. Clin. Endocrinol. Metab. 42, 942
- 86.- HERNANDEZ, A., ZORRILLA, E. y GERSHBERG, H. (1969)
"Decreased insulin production, elevated growth hormone levels and glucose intolerance in liver disease"
J. Lab. Clin. Med. 73, 25
- 87.- BECK, P., PARKER, M.L. y DAUGHADAY, W.H. (1966)
"Paradoxical hypersecretion of growth hormone in response to glucose"
J. Clin. Endocrinol. 26, 423
- 88.- CONN, H.W. y DAUGHADAY, W.H. (1970)
"Cirrhosis and diabetes V. Serum human growth hormone levels in Laennec's cirrhosis"
J. Lab. Clin. Med. 76, 678
- 89.- ZANOBONI, A. y ZANOBONI-MUCIACCIA, W. (1977)
"Elevated basal growth hormone levels and growth hormone response to TRH in alcoholic patients with cirrhosis"
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 576

- 90.- STOCKS, A.E. y POWELL, L.W. (1972)
"Pituitary function in idiopathic haemochromatosis and - -
cirrhosis of the liver"
Lancet, ii, 298
- 91.- OWENS, D., SRIVASTAVA, M.C., TOMPKINS, C.V., NABARRO, J.D.N.
y SÖNKSEN, P.H. (1973)
"Studies on the metabolic clearance rate, apparent distribu
tion space and plasma half-disappearance time of unlabeled
human growth hormone in normal subjects and in patients with
liver disease, thyroid disease and diabetes mellitus"
Europ. J.Clin. Invest. 3, 284
- 92.- MERIMEE, T.J., RABINOWITZ, D., BIGGS, I., BURGUES, S.A., RI
MOIN, D.L. y McKUSICK, U.A. (1967)
"Plasma growth hormone after arginine infusion. Clinical ex
periences"
New Engl. J. Med. 276, 434
- 93.- FRATZ, A.G. y RABKIN, M.T. (1965)
"Effects oestrogen and sex difference on secretion of human
growth hormone"
J. Clin. Endocrinol. 25, 1470
- 94.- BACON, G.E., LOWERY, G.H. y KNOLLER, M. (1969)
"Comparison of arginine infusion and diethyl-stilboestrol
as a mean of provoking growth hormone secretion"
J. Pediatr. 75, 385
- 95.- DAUGHADAY, W.H., HERINGTON, A.C. y PHILLIPS, L.S. (1975)
"The regulation of growth endocrines"
Ann. Rev. Physiol. 37, 211
- 96.- ELDERS, M.J., WINGFIELD, B.S., McNATT, M.L., CLARKE, J.S.
y HUGHES, E.R. (1975)
"Glucocorticoid therapy in children"
Am. J. Dis. Child. 129, 1393
- 97.- PIMSTONE, B.L., BECKER, D.L. y HANSEN, J.D.L. (1972)
"Human growth hormone in protein-calorie malnutrition"
Am. J. Clin. Nutr. 24, 389

- 98.- SALMON, W.D. (1960)
"Importance of aminoacids in the actions of insulin and se
rum sulfation factor to stimulate sulfate uptake by carti-
lage from hypophysectomized rats"
J. Lab. Clin. Med. 56, 673
- 99.- TANNER, J.M. (1972)
"Human growth hormone"
Nature (London), 237, 433
- 100.- GRANT, D.B., HAMBLE, Y.J., BECKER, D. y PIMSTONE, B.L.
(1973)
"Reduced sulfation factor in undernourished children"
Arch. Dis. Childhood 48, 596
- 101.- EISENBERG, S. (1956)
"Blood volume in patients with Laennec's cirrhosis of the -
liver as determined by radioactive chromium-tagged red cells"
Am. J. Med. 20, 189
- 102.- LANGNESS, U. y UDENFRIEND, S. (1974)
"Collagen biosynthesis in non-fibrotic cell livers"
Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 71, 60
- 103.- IRLÉ, C., RYAN, G.B., GABBIANI, G. y MAJNO, G. (1974)
"Myo-fibroblast in the cirrhotic liver"
Experientia, 30, 704
- 104.- CHEN, T., ZETTERMAN, R. y LEEVY, C.M. (1973)
"Sensitized lymphocytes and hepatic fibrogenesis"
Gastroenterology, 65, 532
- 105.- POPPER, H. y BECKER, K. (1975)
"Hepatic fibrosis and collagen metabolism in the liver"
New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corp.
- 106.- BONILLA BLANES, F., BONILLA MIR, F. y AZNAR REIG, A. (1974)
"Estudio comparativo entre la clinica y los resultados de
la exploración radioisotópica funcional y morfológica del hí
gado en pacientes sospechosos de padecer hepatopatía"
Revista Medica de la Universidad de Sevilla. Tomo VI. Num.
28

- 107.- HALES, C.N. y RANDLE, P.J. (1963)
"Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate"
Biochem. J. 88, 137
- 108.- MOLINATTI, G.M., MASSARA, F., STRUMIA, E., PENNISI, F.,
SCASSELLATI, G.A. y VANCHERI, L. (1969)
"Radioimmunoassay of human growth hormone"
J. Nucl. Biol. Med. 13, 26
- 109.- WU, C. y LUNDY, L. (1971)
"Radioimmunoassay of plasma estrogens"
Steroids 18:1, 91