

17
20je



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

IMPORTANCIA DE LAS DETERMINACIONES
HORMONALES POR RADIOINMUNOANALISIS PARA
EL ESTABLECIMIENTO DE UN PATRON HORMONAL
CARACTERISTICO DE LOS DIFERENTES ADENOMAS
HIPOFISARIOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A N :

ROSA ELBA GALVAN DUARTE

ELIZABETH DEL CONSUELO

MONDRAGON SANCHEZ

TESIS CON

FALLA DE ORIGEN

ASESOR: O.F.B. MARIA EUGENIA FONSECA YERENA

COASESOR: O.F.B. RAMON CENDEJAS RAMIREZ



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

~~Importancia de las determinaciones hormonales por~~
~~radioinmunoanálisis para el establecimiento de un patrón~~
~~hormonal característico de los diferentes adenomas~~
~~hipofisarios,~~
que presenta la pasante Rosa-Elba Galván Duarte
con número de cuenta: 7209555-7 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo ; en colaboración con:
Elizabeth del Consuelo Mondragón Sánchez

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de Noviembre de 1994.

PRESIDENTE Q.F.B. ~~Ramón Cedejas Ramírez~~
VOCAL Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa
SECRETARIO M en C. Víctor M Zendejas Buitrón
PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Patricia Campos Peón
SEGUNDO SUPLENTE M en C. Andrés Romero Rojas



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
ACADEMIA DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Importancia de las determinaciones hormonales por
radiolmmunoanálisis para el establecimiento de un patrón
hormonal característico de los diferentes adenomas
hipofisarios.

que presenta la pasante Elizabeth del Consuelo Mondragón Sánchez
con número de cuenta: 720263-2 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo ; en colaboración con :
Rosa Elba Galván Duarte.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de Noviembre de 1994

PRESIDENTE Q.F.B. Ramón Cedejas Ramírez
VOCAL Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa
SECRETARIO M. en C. Victor Zendejas Buitrón
PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Patricia Campos Peón.
SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Andrés Romero Rojas

[Firma]
[Firma]
[Firma]
[Firma]

Con nuestro agradecimiento y admiración para una profesionista ejemplar y ser humano excepcional
Q.F.B.MARIA EUGENIA FONSECA YERENA

A nuestros sinodales por su apoyo, asesoría y estímulo en especial al Q.F.B.RAMON
CENDEJAS RAMIREZ

Con gratitud al :
DR ARTURO ZARATE TREVIÑO
Jefe de la Unidad de Investigación
Médica de Enfermedades Endocrinas
del Hospital de Especialidades CMN.

A nuestros compañeros y amigos por
sus valiosos consejos e inapreciable
amistad que nos brindaron en la
realización de este trabajo GRACIAS.

Con nuestro sincero
afecto y nuestro
agradecimiento a los:
Lícs. Mary Carmen y
Mario por su ayuda
en la realización
de este trabajo.

Dedico este trabajo a la memoria de mi madre
por su amor filial hacia lo que en momento
de la vida formamos para ella su familia.

A mi padre y mis
hermanos por la
entereza y compañía
que me dan.

A Manolo por su amor y comprensión que me ha dado
en los momentos difíciles.

A mis pequeños cariños
MIS SOBRINOS.

A unas amigas
excepcionales Beti,
Consuelo y Raquel.

Rosa ELba

A mis padres con amor y agradecimiento
por la fortaleza, ejemplo y amor que me
brindan.

A mi tía LUCHA
por todo su
cariño y comprensión.

A mis hermanos con
los que he compartido
las cosas más
importantes de mi vida.

A Ramón el gran compañero
de mi vida por todo su
amor y comprensión.

Con cariño
y mayor gratitud a mi
amiga de todos los
momentos difíciles Rosy.

Consuelo.

INDICE

	Pag.
1.0 Generalidades	1
2.0 Resumen	2
3.0 Objetivos	4
4.0 Hipótesis	5
5.0 Introducción	6
5.1. Hipófisis	6
5.1.1. La adenohipófisis	7
5.1.1.1. Control de la secreción hormonal hipofisaria	9
5.1.2. La neurohipófisis	13
5.1.2.1. Control de la secreción de las neurohormonas	13
5.2. Adenomas hipofisarios	14
5.2.1. Clasificación, distribución y frecuencia	14
5.2.2. Prolactinoma (manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento).	17
5.2.3. Acromegalia (manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento).	21
5.2.4. Adenomas del corticotropo (manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento).	23
5.2.5. Gonadotropoma y TSHoma.	26
5.2.6. Adenoma no funcionante	27
5.3. Radioinmunoanálisis	29
5.3.1. Naturaleza del anticuerpo y grado de especificidad	33

5.3.2. Actividad específica del antígeno marcado (Ag*)	39
5.3.3. Método para separar las fracciones	42
5.3.4. Sistema de detección de la radiactividad	43
5.3.5. Optimización y estandarización del ensayo	46
5.3.6. Método utilizado para analizar los resultados	46
5.3.7. Validación del ensayo y control de calidad	49
6.0. Material y Método	54
6.1. Material y equipo de laboratorio	54
6.2. Material biológico	55
6.3. Método	57
7.0. Resultados	61
7.1. Frecuencia de los diferentes adenomas hipofisarios	61
7.2. Frecuencia de los adenomas por edad	64
7.2.1. Prolactinoma	64
7.2.2. Acromegalia	64
7.2.3. Enfermedad de Cushing	64
7.2.4. Adenoma no funcionante	64
7.2.5. Adenoma mixto	69
7.3. Perfil hormonal normal	71
7.4. Perfil hormonal de los diferentes adenomas hipofisarios	73
7.4.1. Prolactinoma	73
7.4.2. Acromegalia	77
7.4.3. Enfermedad de Cushing	77
7.4.4. Adenoma no funcionante	82
7.4.5. Adenoma mixto	82
7.5. Pruebas dinámicas	89
7.5.1. En la enfermedad de Cushing	89

7.5.2. En la acromegalia	89
7.6. Acción farmacológica de la bromocriptina	93
8.0 Discusión	95
9.0 Conclusiones	101
10.0 Bibliografía	103

INDICE DE ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo	TRH	Hormona liberadora de Tirotropina
Abc	Anticuerpo inicial	TSH	Hormona estimulante de tiroides
2Ab	Segundo anticuerpo	U	Unido
Acrom	Acromegalia	x	Media
ACTH	Hormona adrenocorticotropa o Corticotropina		
ADH	Hormona antidiuretica		
Ag	Antígeno		
Ago	Antígeno inicial		
AgL	Antígeno libre		
AgU	Antígeno unido		
Ag*	Antígeno marcado		
Ag*L	Antígeno marcado libre		
Ag*U	Antígeno marcado unido		
BSA	Albúmina bovina sérica		
Cort	Cortisol		
CPM	Cuentas por minuto		
CT	Cuentas Totales		
CV	Coefficiente de Variacion		
DA	Dopamina		
DE	Desviación estandar		
Enf.	Enfermedad		
E2	Estradiol		
Est	Estandar		
Fig	Figura		
FSH	Hormona folículo estimulante		
GH	Hormona de Crecimiento		
Gast	Gastrina		
Gn-RH	Hormona liberadora de gonadotropinas		
I	Yodo		
K	Constante		
Ka	Constante de afinidad		
L	Libre		
Logit	Logaritmo natural		
Log	Logaritmo decimal		
M	Molar		
MSH	Hormona estimulante de melanocitos		
ng	Nanogramos		
No.	Número		
NF	No funcionante		
PRL	Prolactina		
RIA	Radioinmunoanálisis		
REF	Referencia		
SNC	Sistema nervioso central		
TAC	Tomografía axial computarizada		
T.A.	Temperatura ambiente		
T3	Triyodotironina		
T4	Tiroxina		
Test	Testosterona		

INDICE DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1.	Acción de las hormonas hipofisarias sobre otras glándulas endocrinas.	8
Figura 2.	Control de la secreción hormonal.	11
Figura 3.	Curva estandar de hormona de crecimiento.	32
Figura 4.	Determinación de la constante de afinidad.	37
Figura 5.	Titulación del anticuerpo.	40
Figura 6.	Método de separación.	44
Figura 7.	Método logit log para prolactina.	48
Figura 8.	Perfil de precisión..	52
Figura 9.	Diagrama de flujo.	60
Figura 10.	Frecuencia de aparición de los diferentes adenomas.	63
Figura 11.	Frecuencia de aparición de prolactinoma en mujeres.	65
Figura 12.	Frecuencia de aparición de prolactinoma en hombres.	65
Figura 13.	Frecuencia de aparición de acromegalia en mujeres.	66
Figura 14.	Frecuencia de aparición de acromegalia en hombres.	66
Figura 15.	Frecuencia de aparición de enfermedad de Cushing en mujeres.	67
Figura 16.	Frecuencia de aparición de adenoma no funcionante en mujeres.	68
Figura 17.	Frecuencia de aparición de adenoma no funcionante en hombres.	68
Figura 18.	Frecuencia de aparición de adenoma mixto en mujeres.	70
Figura 19.	Frecuencia de aparición de adenoma mixto en hombres.	70
Figura 20.	Perfil hormonal normal en mujeres.	72
Figura 21.	Perfil hormonal normal en hombres.	72

Figura 22.	Perfil hormonal del prolactinoma en mujeres.	74
Figura 23.	Perfil hormonal del prolactinoma en hombres.	74
Figura 24.	Concentración de prolactina en los diferentes tipos de adenomas (mujeres).	76
Figura 25.	Concentración de prolactina en los diferentes tipos de adenomas (hombres).	76
Figura 26.	Perfil hormonal de acromegalia en mujeres.	78
Figura 27.	Perfil hormonal de acromegalia en hombres.	78
Figura 28.	Concentración de hormona de crecimiento en los diferentes tipos de adenomas (mujeres).	80
Figura 29.	Concentración de hormona de crecimiento en los diferentes tipos de adenomas (hombres).	80
Figura 30.	Concentraciones de cortisol y ACTH en la enfermedad de Cushing en mujeres.	81
Figura 31.	Concentraciones de cortisol y ACTH en la enfermedad de Cushing en hombres.	81
Figura 32.	Concentraciones de cortisol en los diferentes tipos de adenomas (mujeres).	84
Figura 33.	Concentraciones de cortisol en los diferentes tipos de adenomas (hombres).	84
Figura 34.	Perfil hormonal del adenoma no funcionante en mujeres.	85
Figura 35.	Perfil hormonal del adenoma no funcionante en hombres.	85
Figura 36.	Perfil hormonal del adenoma mixto en mujeres.	87
Figura 37.	Perfil hormonal del adenoma mixto en hombres.	87
Figura 38.	Ritmo circadiano de cortisol en individuos sanos.	90
Figura 39.	Ritmo circadiano en pacientes con enfermedad de Cushing.	90
Figura 40.	Prueba de supresión con dexametasona en individuos sanos.	91
Figura 41.	Prueba de supresión con dexametasona en pacientes con enfermedad de Cushing.	91

Figura 42.	Prueba de tolerancia a la glucosa en pacientes acromegálicos con supresión parcial de GH.	92
Figura 43.	Prueba de tolerancia a la glucosa en pacientes acromegálicos en donde no hay supresión de la GH.	92
Figura 44.	Acción farmacológica de la bromocriptina en pacientes con prolactinoma.	94
Figura 45.	Acción farmacológica de la bromocriptina en pacientes con acromegalia.	94

INDICE DE TABLAS

Pag.

Tabla 1.	Frecuencia de adenomas hipofisarios.	16
Tabla 2.	Situaciones clínicas y medicamentos que causan hiperprolactinemia funcional.	18
Tabla 3.	Criterios para el diagnóstico de los adenomas hipofisarios.	28
Tabla 4.	Estudio de la especificidad de un antisuero para la hormona de crecimiento frente a otras hormonas hipofisarias.	38
Tabla 5.	Determinaciones hormonales por RIA.	57
Tabla 6.	Protocolo general del RIA de doble anticuerpo.	58
Tabla 7.	Protocolo general del RIA de fase sólida.	59
Tabla 8.	Frecuencia de los diferentes adenomas hipofisarios.	62
Tabla 9.	Niveles hormonales en el prolactinoma.	75
Tabla 10.	Niveles hormonales en acromegalia.	79
Tabla 11.	Niveles hormonales en la enfermedad de Cushing.	83
Tabla 12.	Niveles hormonales en el adenoma no funcionante.	86
Tabla 13.	Niveles hormonales en el adenoma mixto.	88

1.0 GENERALIDADES

Tradicionalmente los adenomas hipofisarios, se han clasificado en base a su afinidad tincional histológica, su producción hormonal y el cuadro clínico de los pacientes, en varios tipos: Acromegalia el productor de hormona de crecimiento (GH), prolactinoma el productor de prolactina (PRL), enfermedad de Cushing elevación característica de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e hipercortisolismo y finalmente adenoma no funcionante el que no produce ninguna hormona en particular, otros adenomas que se encuentran en menor proporción son: Los adenomas de células gonadotróficas productores de FSH y LH, y los adenomas de células tirotróficas que producen la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y adenoma mixto con una producción de más de una hormona diferentes a los anteriores. Su diagnóstico se basa en el cuadro clínico del paciente, un estudio radiológico y los resultados de laboratorio demuestran elevados niveles séricos de las diferentes hormonas dependiendo del tipo de adenoma. El método más utilizado en la actualidad para determinar las hormonas, es el radioinmunoanálisis (RIA). Procedimiento que pertenece a los métodos conocidos como inmunoensayos. A la fecha existen en el mercado estuches comerciales bien estandarizados que permiten efectuar la cuantificación de las diferentes hormonas mencionadas, de una manera rápida y sencilla, por lo cual se utilizaron en este estudio.

2.0 RESUMEN

Se estudiaron 149 pacientes con diagnóstico de adenoma hipofisario, a los cuales se les realizaron las siguientes determinaciones hormonales: Prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), cortisol (Cort), estradiol (E2), testosterona (Test) y gastrina (Gast).

Se determinó la frecuencia con la que se presentó cada tipo de adenoma; la frecuencia de aparición por edad y finalmente el perfil hormonal señalando la alteración que se presenta debido a la hipersecreción característica de cada uno de ellos dependiendo del tipo de adenoma, así como también en aquellos en los que no hay hipersecreción característica (no funcionantes).

En la acromegalia se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa en 7 pacientes, observando dos tipos de respuesta, la primera una supresión parcial en la secreción de GH y la segunda una respuesta paradójica (no supresión), pero en ninguno de los casos la concentración de GH fue menor de 2 ng/ml con lo que confirmamos el diagnóstico de acromegalia. En sujetos normales, al realizar esta prueba, la secreción de GH se suprime por debajo de 2 ng/ml.

En la enfermedad de Cushing se determinó el ritmo circadiano de la secreción de cortisol en 2 sujetos normales y 3 pacientes con dicha enfermedad. También para la enfermedad de Cushing se utilizó la prueba de supresión con dexametasona en dos sujetos normales y 6 pacientes con la enfermedad de Cushing para confirmar el diagnóstico. En estos pacientes se observa la ausencia del ritmo circadiano así como una falta de supresión en la secreción de

ACTH por la dexametasona

En los casos de acromegalia y prolactinoma se estudio la respuesta de cinco pacientes a la administración de la bromocriptina (2 casos de acromegalia y 3 con prolactinoma), en ambos casos se observo una disminución en la concentración de la GH y la PRL por el efecto dopaminérgico de este fármaco.

Al mismo tiempo que se trabajaron los sueros de pacientes con adenomas se procesaron muestras de 20 sujetos sanos de ambos sexos, en edad reproductiva que presentaron una producción hormonal normal y que fueron considerados como grupo control.

Los datos obtenidos fueron analizados comparativamente utilizando la media, DE y t student con objeto de conocer si entre los grupos estudiados existen diferencias significativas, aplicándose esta prueba a cada una de las determinaciones hormonales efectuadas.

La utilidad del RIA en las determinaciones hormonales apoyo el diagnóstico de los adenomas hipofisarios y en el presente trabajo estableció la frecuencia de aparición de los adenomas hipofisarios, su frecuencia de aparición por edad y por sexo y el perfil característico, que manifiesta la alteración en el medio hormonal por la presencia de los mismos.

Así mismo, las determinaciones hormonales en pruebas dinámicas para el diagnóstico de la enfermedad de Cushing y la acromegalia remarcan su utilidad en la corroboración de estos diagnósticos.

En el tratamiento una serie de determinaciones de la PRL en el prolactinoma y de GH en la acromegalia posteriores a la administración de la bromocriptina, nos manifiestan la utilidad de la misma en estos tumores

3.0 OBJETIVOS

1. En una población que acude al servicio de endocrinología del hospital de tercer nivel de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI con diagnóstico de adenoma hipofisario, previamente valorados por las manifestaciones clínicas que presentan y con estudios radiológicos que indican la presencia de un adenoma hipofisario se realizarán las siguientes determinaciones hormonales: hormona foliculo estimulante, hormona luteinizante, prolactina, hormona de crecimiento, hormona adremocorticotropa, cortisol, estradiol, testosterona y gastrina; utilizando como método el RIA. Con los datos obtenidos se realizará: a) la clasificación de los adenomas hipofisarios y su frecuencia. b) la frecuencia de aparición por edad en ambos sexos, c) las alteraciones hormonales que podrían establecer un perfil característico para cada uno de los adenomas hipofisarios.
2. Al mismo tiempo se tomarán muestras de individuos sanos, en edad reproductiva y de ambos sexos (que no presenten alteración en su producción hormonal), para establecer un estudio comparativo.
3. Realizar pruebas dinámicas específicas para los diagnósticos de acromegalia y enfermedad de Cushing, en las que se utilizarán las determinaciones hormonales para corroborar de esta manera ambos diagnósticos en base a la respuesta que se presente.
4. Observar la acción farmacológica de la bromocriptina en pacientes con diagnóstico de prolactinoma y acromegalia mediante la determinación de la GH y PRL a diferentes tiempos.

4.0 HIPOTESIS

Los adenomas hipofisarios pueden causar alteraciones en la secreción hormonal por diferentes mecanismos: a) Por hipersecreción de algunas hormonas, b) por cambios en los mecanismos de regulación hormonal, ya que modifican la retroalimentación negativa, c) por alteración de los ritmos circadianos ; si bien, pudiera no presentarse ninguna de las alteraciones mencionadas.

Estas alteraciones en la secreción hormonal pueden ser determinadas mediante la medición de la concentración de las hormonas ya que permitirán conocer la naturaleza de la hipersecreción hormonal y por lo tanto la estirpe del tumor y una vez establecida su naturaleza, se podrá efectuar la clasificación de los diferentes tipos de adenomas, así como determinar su frecuencia. A la vez podrá obtenerse el patrón hormonal (perfil) que puede ser diferente para cada tipo de adenoma, dependiendo del ambiente hormonal modificado, como consecuencia de la presencia del tumor.

5.0 INTRODUCCION

5.1 HIPOFISIS

La hipófisis es una estructura compleja que se encuentra en una cavidad de paredes óseas, la silla turca, en el hueso esfenoides, a nivel de la base del cráneo. La silla turca se encuentra separada de la cavidad craneal hacia arriba por una reflexión firme de la dura-madre, el diafragma de la silla, a través de la cual el tallo de la hipófisis y los vasos sanguíneos que lo acompañan llegan al cuerpo principal de la glándula. La hipófisis es un órgano pequeño cuyas dimensiones normales son aproximadamente, 10 por 13 mm, por 6 mm, y que pesa en términos generales, 0.5 g. El lóbulo anterior constituye el 75% del peso total de la glándula. En la mujer aumenta de tamaño durante el embarazo y puede llegar a pesar 1 g. La parte intermedia, que se encuentra en la hipófisis de la mayor parte de los vertebrados, falta virtualmente en la hipófisis humana. La hipófisis se forma al principio de la vida embrionaria a partir de la fusión de dos eminencias ectodérmicas huecas de orígenes diversos. Recibe su riego sanguíneo de dos fuentes: La sangre arterial que llega a ella desde ramas de la arteria hipofisaria superior, rama de la arteria carótida interna y la sangre venosa que entra en la hipófisis por un sistema portal, de importancia fisiológica, que se origina en estructuras vasculares especializadas de la eminencia media. Esta glándula se encuentra dividida en dos partes fisiológicamente distintas, la hipófisis anterior o adenohipófisis y la hipófisis posterior o neurohipófisis (58).

5.1.1 Adenohipófisis

La adenohipófisis desempeña un papel muy importante en el funcionamiento normal del sistema endocrino, ya que la mayoría de las hormonas que produce, controlan a otras glándulas endocrinas como son: la suprarrenal, la tiroides y las gónadas. Una hipófisis intacta es esencial, no sólo para una función tiroidea y suprarrenal normal, sino también para el crecimiento normal y para el desarrollo y función sexual adecuada figura 1 (41).

Las hormonas secretadas por la hipófisis son:

Hormona de Crecimiento (GH)

Prolactina u Hormona Lactogénica (PRL)

Hormona Adrenocorticotropa (ACTH)

Hormona Estimulante de los Melanocitos (MSH)

Hormona Estimulante del Tiroides (TSH)

Hormona Folículo Estimulante (FSH)

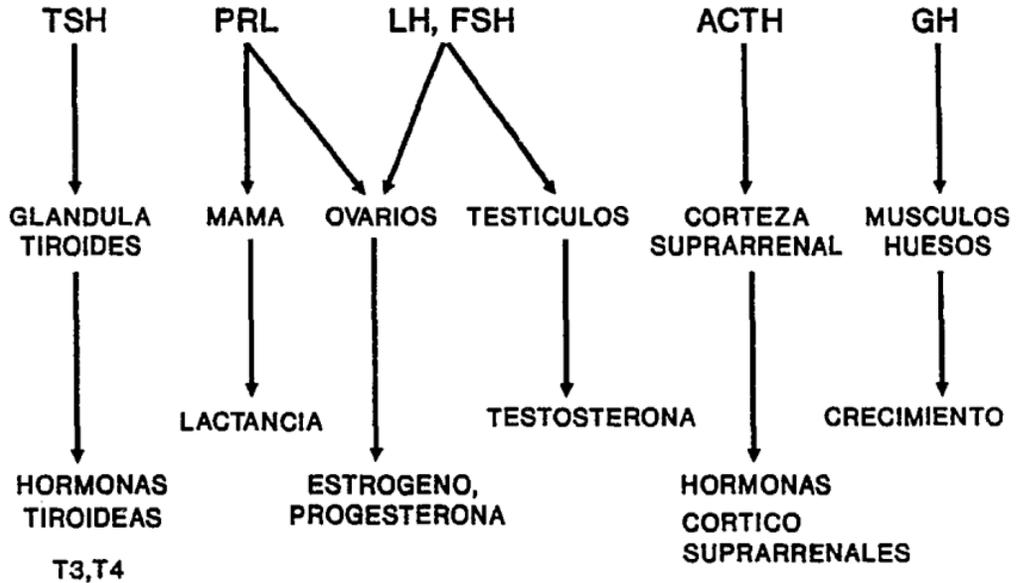
Hormona Luteinizante (LH)

La FSH y la LH son llamadas también gonadotropinas hipofisarias, para distinguirlas de la gonadotropina coriónica (HCG), sintetizada por la placenta (22).

Cada hormona es secretada por un tipo celular único, tal como se ha demostrado mediante técnicas especiales de tinción, ultramicroscopía y estudios inmunológicos. Las preparaciones histológicas normales muestran sólo tres tipos de células: Acidófilas, basófilas y cromóforas (35).

Basándonos en esta clasificación, la hormona de crecimiento y la prolactina son producidas por las células acidófilas, mientras que la hormona adrenocorticotropa, la hormona estimulante del

**FIG.1 ACCION DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS
SOBRE OTRAS GLANDULAS ENDOCRINAS**



tiroides, la hormona estimulante de los melanocitos y las gonadotrofinas lo son por las células basófilas (18).

El papel exacto de las células cromóforas es incierto, sin embargo, parecen originarse en esa zona los adenomas no funcionantes que carecen de una hipersecreción hormonal característica (células nulas). No obstante, se han asociado con hipersecreción de GH y de ACTH (33).

5.1.1.1 Control de la secreción hormonal hipofisaria

El hipotálamo y el lóbulo anterior de la hipófisis forman una unidad anatómo-funcional que se comunica mediante el llamado sistema venoso portal hipofisario, que es importante porque permite que las hormonas producidas en el hipotálamo puedan pasar a la adenohipófisis para llevar a cabo el control de la secreción hormonal. El sistema portal hipofisario está constituido por ramas de la arteria hipofisaria superior que se divide en una red de capilares que penetran la eminencia media a través de las fibras nerviosas hipotalámicas. Esta red se convierte posteriormente en vasos que pasan por debajo del tallo hipofisario, para formar una segunda red de capilares, ya en la hipófisis anterior. Así los factores reguladores hipotalámicos son transportados por el sistema venoso a la adenohipófisis donde controlan la secreción de las hormonas adenohipofisarias. En la mayoría de los casos su acción es estimulante, de ahí el nombre de hormonas liberadoras; sólo en el caso de la PRL y la MSH las hormonas hipotalámicas que controlan su secreción, tienen una acción predominantemente inhibidora. A su vez las hormonas hipofisarias una vez secretadas, son transportadas por el

torrente circulatorio hasta el órgano blanco donde van a ejercer su acción, lográndose así la integración del eje hipotálamo-hipófisis-órgano blanco (41).

Existen varios mecanismos que controlan la secreción de las hormonas, los más importantes se describen a continuación (Fig.2):

A) Retroalimentación Negativa

El hipotálamo y la adenohipófisis estimulan la secreción del órgano blanco, pero a la vez son sensibles a los niveles circulantes de la hormona que produce dicha glándula en respuesta al estímulo, de ahí que cuando esta alcanza valores elevados, deprime la secreción de la hormona liberadora a nivel hipotalámico, y por lo tanto la de la hormona trófica. Así por ejemplo, en el caso del eje hipotálamo - hipófisis - tiroides, la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH) se suprimen cuando se eleva la tiroxina (T4), mientras que por el contrario valores bajos de la hormona estimulan su secreción (43).

B) Ritmos de Secreción

Normalmente las hormonas son secretadas con un ritmo determinado que puede ser de tipo pulsátil o episódico, o bien, por un ritmo muy regular de 24 horas que se conoce como ritmo circadiano; su determinación tiene valor diagnóstico ya que cuando se modifica es indicador de alteraciones en la secreción hormonal (22).

C) Estímulos del Sistema Nervioso Central

Numerosos estímulos que se reciben en el SNC son muy

CONTROL DE LA SECRECION HORMONAL

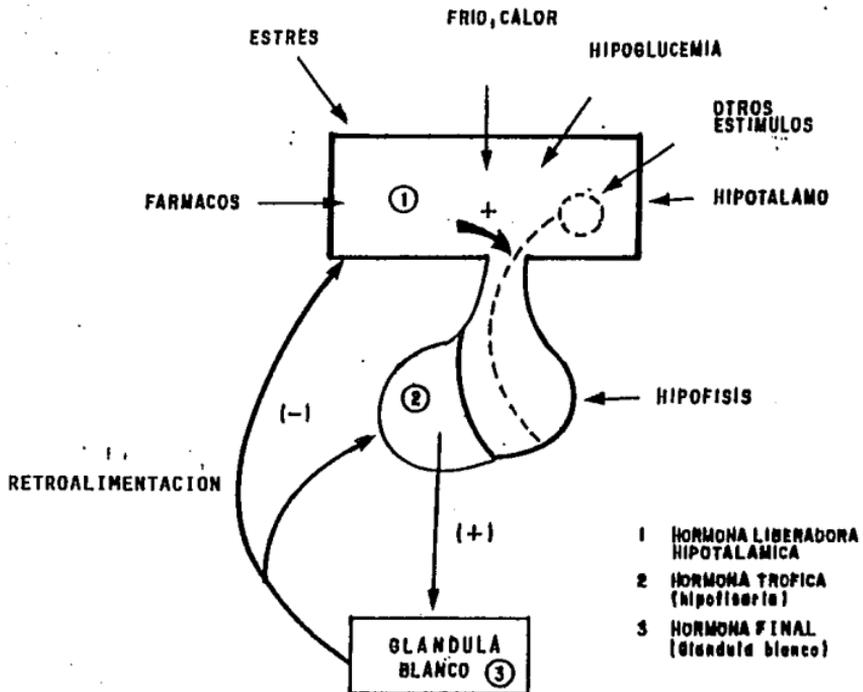


FIG. 2

EJE HIPOTALAMO - HIPOFISIS - ORGANO BLANCO

importantes para el control de la secreción de las hormonas. Se ha demostrado que el SNC y el Sistema Endocrino se encuentran íntimamente relacionados; el primero responde a diversos estímulos externos, produciendo sustancias químicas conocidas como neurotransmisores, los cuales pueden modificar la liberación de las hormonas hipotalámicas, la secreción hipofisaria y la respuesta de las hormonas producidas por el órgano blanco. Entre estos estímulos pueden mencionarse (26).

El Estrés. Un traumatismo o el ejercicio físico intenso pueden estimular la secreción de hormonas como la ACTH, PRL, GH y otras. También el estrés de la hipoglucemia inducida por insulina desencadena secreción de catecolaminas, ACTH, cortisol y GH. El estrés emocional puede estimular la liberación de ciertas hormonas; debido a ello enfermedades psiquiátricas como la depresión, pueden condicionar alteraciones hormonales y viceversa, una enfermedad primariamente endocrina, puede dar manifestaciones psiquiátricas (19).

Fármacos

La estrecha relación entre los sistemas nervioso y endocrino se ha demostrado también, por el efecto de ciertos fármacos que modifican la secreción de las hormonas. Así por ejemplo la clorpromacina, que interfiere con la acción de la dopamina, reduce la secreción de hormonas hipotalámicas que responden a este neurotransmisor. El resultado es la reducción de hormonas como la GH y un aumento de la secreción de la PRL por reducción del factor inhibidor. Inversamente la L-dopa, precursor de la dopamina, aumenta su concentración y la

secreción hipotalámica de las hormonas liberadoras, determinando un aumento en la secreción de GH y un descenso de la PRL. Estas acciones específicas de los fármacos sobre la secreción hormonal, se aprovechan en la clínica para establecer "pruebas dinámicas" que son de gran utilidad para el estudio de los trastornos hipotálamo hipofisarios. Son también la base del mecanismo de acción de muchos medicamentos que se utilizan con fines terapéuticos para el control de la secreción hormonal, en pacientes con problemas endocrinos (57).

5.1.2. Neurohipófisis

La neurohipófisis secreta dos hormonas estructuralmente muy semejantes:

- A) La vasopresina u hormona antidiurética (ADH) tiene como función principal el mantenimiento de la osmolaridad y el volúmen del líquido extracelular; su deficiencia conduce a la diabetes insípida (44).
- B) La oxitocina, que actúa fundamentalmente sobre la glándula mamaria durante la lactancia, determina la expulsión de leche. También estimula la producción de las contracciones uterinas, teniendo así un papel importante durante el trabajo de parto (24).

5.1.2.1 Control de la Secreción de las Neurohormonas

Estas dos hormonas no se producen en la hipófisis, sino en el hipotálamo pasando a través de fibras nerviosas que atraviesan el tallo hipofisario hasta llegar a la neurohipófisis, donde son secretadas, en respuesta a estímulos nerviosos específicos. La sección del tallo hipofisario o la destrucción de la hipófisis,

que normalmente conducen a una insuficiencia adenohipofisaria severa, no produce necesariamente una diabetes insípida, ya que las células productoras de ADH en el hipotálamo no son dañadas y pueden secretar la hormona al torrente circulatorio (7).

5.2. ADENOMAS HIPOFISARIOS

Son tumores que se producen por hiperplasia o hipertrofia del tejido glandular de la hipófisis anterior o adenohipófisis (29).

5.2.1. Clasificación, distribución y frecuencia de los adenomas hipofisarios.

Los adenomas hipofisarios se han clasificado tradicionalmente por sus características histológicas y más recientemente por su tamaño tumoral y las pruebas de invasividad en:

A) Adenomas Encapsulados

B) Adenomas Invasores

A) Los Adenomas Encapsulados se clasifican de acuerdo a su tamaño en:

- Microadenomas, si su diámetro es menor de 10 mm
- Macroadenomas, si su diámetro es mayor de 10 mm

Estos adenomas se encuentran confinados totalmente a la cubierta osteoaponeural de la silla turca.

Los Adenomas Invasores pueden ser:

- Localizados
- Difusos

Los adenomas invasores se extienden más allá de los confines de cubierta osteoaponeural (1).

Los adenomas hipofisarios carecen de cápsulas verdaderas y los

límites entre la adenohipófisis normal y el adenoma pueden consistir solamente en una concentración de células normales entremezcladas con las células adenomatosas y un grado variable de estroma normal condensado. Al crecer el adenoma ejerce, al principio, una presión localizada sobre la silla ósea, que se convierte más tarde en generalizada y que tiene como consecuencia la ampliación sillar. Se reconoce, actualmente, que los macroadenomas tienen una capacidad impresionante para invadir las estructuras óseas y vasculares cercanas. Por abajo, el adenoma puede penetrar en el piso delgado de la silla y entrar en el seno esfenoidal, e incluso aparecer en la nasofaringe. La invasión lateral lleva células tumorales hacia la vaina carotídea y los tejidos del seno cavernoso, con lo que se elimina definitivamente la posibilidad de la asistencia quirúrgica. La extensión de los adenomas encapsulados o invasores hacia arriba del tumor por el hipotálamo, puede producir trastornos del conocimiento, hiperfagia y regulación anormal de la temperatura (40).

Los craneofaringiomas pueden producir obstrucción del drenaje del líquido cefalorraquídeo con creación de hidrocefalia, pero este fenómeno es raro en caso de adenomas hipofisarios (31).

Los tumores hipofisarios particularmente invasores tienden abrirse paso hacia las fosas media y posterior y a producir manifestaciones del tronco del encéfalo, sin embargo, son raros los casos de metástasis a distancia, por las meninges raquídeas hacia el hígado (48).

Todos los tumores hipofisarios, pero en particular los adenomas del corticotropo y somatotropo pueden experimentar

infarto hemorrágico y producir la llamada apoplejía hipofisaria.

Distribución de los Tumores Hipofisarios

Las células secretoras de la adenohipófisis no se encuentran distribuidas con uniformidad por toda la glándula, las somatotrofas y las lactotrofas se encuentran más a menudo en las alas laterales de la hipófisis, mientras que las células que secretan hormonas glucoproteicas y corticotropina se concentran dentro del reborde mucoide central de la glándula.

Diferentes tipos de Adenomas Hipofisarios de acuerdo a su estirpe celular y su frecuencia (3,36) tabla 1.

TABLA No. 1 FRECUENCIA DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS

TIPO DE ADENOMA	TIPO CELULAR	HORMONA PRODUCIDA	FRECUENCIA%
PROLACTINOMA	LACTOTROPO	PROLACTINA (PRL)	32
ACROMEGALIA	SOMATOTROPO	HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)	18
E. DE CUSHING	CORTICOTROPO	ACTH Y PEPTIDOS DERIVADOS DE LA OPIOMELANOCORTINA	15
ADENOMA NO FUNCIONANTE	CELULAS NULAS	SIN HIPERSECRECION HORMONAL	15
ADENOMA MIXTO	SOMATOTROPO Y LACTOTROPO	HORMONA DE CRECIMIENTO Y PROLACTINA	10
GONADOTROPINOMA	GONADOTROPO	LH Y FSH	5
TIROTROPINOMA	TIROTROPO	HORMONA ESTIMULANTE DE TIROIDES (TSH)	1
ONCOCITOMA		SIN HIPERSECRECION HORMONAL	2
NO CLASIFICADOS			2

5.2.2. Prolactinomas

Los prolactinomas son los adenomas secretores más comunes de la hipófisis. En la mujer, aproximadamente la mitad de los adenomas son microadenomas, en tanto que el resto son macroadenomas al momento del diagnóstico. Es mucho menor la frecuencia de microprolactinoma en el varón, lo que se puede relacionar a un reconocimiento tardío, o por ser diferentes las características del crecimiento del prolactinoma en la mujer. Existe la posibilidad de que los estrógenos, en particular cuando aumentan durante el embarazo o cuando se administran como fármacos anticonceptivos, produzcan aumento de la frecuencia de estos adenomas (49).

Manifestaciones Clínicas

Las mujeres que tienen microadenomas suelen presentar galactorrea o amenorrea-galactorrea. Hasta el 20% a 33% de las mujeres jóvenes que sufren amenorrea durante más de seis meses tienen hiperprolactinemia persistente, pero menos de la mitad de las pacientes hiperprolactinémicas experimentan galactorrea. La galactorrea suele consistir en descarga de gotas de leche espontáneamente o con presión. En algunas pacientes no se observa galactorrea hasta que el médico exprime las glándulas mamarias. La galactorrea que suele acompañar a la hiperprolactinemia sostenida, no suele guardar relación alguna con el nivel de prolactina. Algunas pacientes pueden tener incremento de las concentraciones de PRL y en otros casos no, y esta forma de galactorrea puede presentar una hipersensibilidad mamaria a las concentraciones normales de esteroides sexuales y PRL (8,32).

La duración de los síntomas antes del diagnóstico de microadenoma suele ser muy prolongada. La amenorrea puede preceder por años, o incluso décadas en las que se van aumentando las irregularidades menstruales. En ciertos casos después del embarazo aparece amenorrea y galactorrea (61).

Existen otras situaciones clínicas y medicamentos que causan una hiperprolactinemia funcional todas ellas referidas en la tabla 2.

Tabla 2. Situaciones clínicas y medicamentos que causan hiperprolactinemia funcional:

Impulsos Neurógenos Aferentes

Lesiones de la pared torácica
Estimulación del pezón
Estrés
Herpes Zooster

Alteraciones Hipotalámicas

Enfermedad hipotalámica difusa (encefalitis, etc.)
Enfermedad granulomatosa e infiltrativa (sarcoide, histiocitosis)
Tumores (craneofaringiomas, meningiomas, etc.)
Metabólica (uremia)
Traumática (sección del tallo)

Enfermedades Hipofisarias

Prolactinomas
Adenomas lactrotropeos y somatotropeos mixtos
Adenomas de células madres

Endocrinas

Estrógenos
Embarazo
Hipotiroidismo

Transmisión Dopaminérgica Alterada

Fármacos que bloquean la DA
Fenotiacinas
Butirofenonas
Benzamidas (metoclopramida, sulpirida)
Agentes depletores de DA
Alfa metildopa
Reserpina

Diagnóstico

Se encuentra hiperprolactinemia cuando dos o más mediciones repetidas de la PRL indican elevación persistente. En la mayoría de los laboratorios los límites superiores de la concentración normal de PRL son de 20 ng/ml para sujetos ambulatorios sanos, aunque existen límites más amplios en los pacientes no endocrinos hospitalizados. Se requieren mediciones repetidas, porque a menudo es variable la secreción en los prolactinomas. Los pacientes con prolactinoma pierden su ritmo de secreción nocturna, pero esta no es una observación diagnóstica de utilidad (16).

El diagnóstico de prolactinoma requiere que se excluyan otras causas funcionales de hiperprolactinemia, algunas de ellas acompañadas también de amenorrea y galactorrea (16).

El diagnóstico de prolactinoma es razonablemente seguro, si existen pruebas radiológicas de adenoma hipofisario con hiperprolactinemia. Se han propuesto los siguientes criterios para diagnosticar estos adenomas:

Concentración de la PRL plasmática. Son poco frecuentes los casos de amenorrea y galactorrea por causas funcionales que cursan una concentración sérica de PRL superior a 100 ng/ml, por lo tanto el encontrar cifras mayores superiores de PRL, es sugestivo de la presencia de un tumor hipofisario (16).

Capacidad de respuesta a la TRH. La mayor parte de los casos de prolactinoma no tienen incremento importante de la PRL sérica después de la administración intravenosa de 400 ng de TRH, en tanto que las personas normales tienen un incremento de dos a

tres veces sobre la concentración basal. Hay dudas sobre la especificidad de esta prueba, porque los casos de hiperprolactinemia inducida por fármacos no reaccionan tampoco a la TRH. Esto puede significar que cualquier lactotrofo que se encuentre en fase secretoria vigorosa puede no responder al aumento de TRH (16).

Inhibición dopaminérgica. Los fármacos antagonistas de la dopamina como la clorpromacina actúan primordialmente sobre el hipotálamo bloqueando la transmisión dopaminérgica y por lo tanto la inhibición de PRL, de tal manera que en los sujetos normales estas drogas estimulan la secreción de PRL, no respondiendo los casos de prolactinoma. Por el contrario la L-DOPA y la bromocriptina, fármacos dopaminérgicos, inhiben la secreción de PRL en sujetos normales y en los pacientes con hiperprolactinemia funcional, lo mismo que en los pacientes con un prolactinoma, de ahí su uso en la clínica (16).

Tratamiento Médico

Han sido muy eficaces el mesilato de bromocriptina (6) y la bromoergocriptina a dosis de 5-10 mg/día para reducir las concentraciones de PRL, controlar la galactorrea y restablecer el ciclo menstrual. Estos fármacos han tenido éxito también para restablecer la fecundidad en mujeres con hiperprolactinemia y promover el embarazo, sin embargo, en aproximadamente un 10% de las mujeres embarazadas que toman bromocriptina se encuentran pruebas de aumento del tamaño del adenoma, con alteraciones de la visión, riesgo que debe considerarse (11,56).

5.2.3. Acromegalia

El hipersomatotropismo se define como la elevación de la concentración de la hormona de crecimiento (GH) por arriba de 10 ng/ml. Se ha encontrado hipersomatotropismo funcional en ciertos tipos de deficiencia nutricional grave, diabetes no controlada, en hepatopatía o nefropatía crónica y rara vez, en la falla del crecimiento tipo enanismo de Laron. En ausencia de estos trastornos, cuando la hipersecreción se acompaña de datos clínicos de crecimiento excesivo, casi todos los casos se deben a un adenoma del somatotrópo (27).

Los síntomas del exceso de hormona de crecimiento pueden aparecer a cualquier edad, pero se reconocen más a menudo entre la tercera y la quinta década de la vida. Cuando el trastorno se inicia durante la infancia, las epífisis de los huesos aún abiertos permiten el crecimiento excesivo del esqueleto y se produce gigantismo. No se ha reconocido una predisposición clara en un sexo o raza. La acromegalia puede ser también una manifestación rara del síndrome de adenomatosis endocrina múltiple (6).

Manifestaciones Clínicas

El primer dato clínico sugestivo de acromegalia es la tosquedad de los rasgos faciales y la tumefacción de tejidos blandos de pies y manos. Estos cambios suelen ocurrir de manera tan gradual que no les reconoce hasta que ha progresado la enfermedad. Puede haber hipertrichosis y exagerada secreción cutánea. Los cambios en el aspecto facial son a menudo muy acentuados, debido a un crecimiento excesivo de la mandíbula y de los pómulos. Las víceras también se agrandan y es frecuente encontrar

cardiomegalia y esplenomegalia. El tiroides también se agranda y aunque estos pacientes son habitualmente eutiroides pueden presentar hipertiroidismo. En el sexo femenino son frecuentes los trastornos menstruales. En casi la mitad de los casos de acromegalia se encuentra alteración de la tolerancia a la glucosa aunque solo ocurre diabetes en 10% de los casos y es frecuente encontrar resistencia a la insulina, con niveles plasmáticos muy elevados (5).

Diagnóstico

El diagnóstico de la acromegalia se basa en los hechos clínicos y los datos radiológicos y se confirma por la demostración de una cifra elevada de hormona de crecimiento, que no es suprimida por la carga de glucosa oral.

Los niveles plasmáticos de hormona de crecimiento pueden utilizarse también para valorar la efectividad del tratamiento.

1. Niveles basales. Los valores de la hormona de crecimiento en un sujeto acromegálico en reposo y después de una noche de ayuno, son generalmente superiores a los normales .
2. Prueba de tolerancia a la glucosa. En una curva de tolerancia a la glucosa en un sujeto normal, los valores de la hormona del crecimiento disminuyen a menos de 5 ng/ml una a dos horas después. En la acromegalia, en la que la secreción de GH es autónoma esto no ocurre, los valores de la hormona del crecimiento pueden permanecer constantes, o incluso aumentar, en lugar de suprimirse (respuesta paradójica) (32).

Tratamiento

Se prefiere el tratamiento de ablación, al tratamiento médico con que se cuenta en la actualidad. Existen casos en los que la operación quirúrgica, la radioterapia o ambas han fracasado para controlar el hipersomatotropismo. Otros autores han utilizado la bromocriptina y fármacos dopaminérgicos en la disminución de la concentración de hormona de crecimiento (37, 56).

5.2.4. Adenomas del Corticotropo

En 1932 Harvey Cushing propuso que los adenomas de células hipofisarias basófilas podía originar el síndrome que ahora lleva su nombre y que se conoce como enfermedad de Cushing (12).

Durante los últimos cinco años la hipótesis de Cushing ha recibido aceptación general ya que los adenomas del corticotropo son la principal causa de la enfermedad y su curación mediante adenomectomía es la prueba más convincente al respecto (2).

Los adenomas del corticotrópo pueden presentarse a cualquier edad, pero son raros durante la infancia. La enfermedad se produce con mayor frecuencia en la mujer que en los varones y por lo general suele ocurrir en la tercera a la cuarta década de la vida (2).

La concentración de ACTH en pacientes con enfermedad de Cushing no tratados, medida bajo condiciones de ayuno matutino, sólo esta moderadamente elevada y aproximadamente, en la mitad de los casos, se encuentran dentro de límites normales, lo que indica que la secreción de ACTH en los adenomas del corticotrópo se encuentra regulada en mayor o menor grado por los corticoesteroides (14).

Manifestaciones Clínicas

Las anomalías predominantes en los pacientes con enfermedad de Cushing reflejan los efectos característicos del cortisol. Algunos pacientes presentan una disminución de la tolerancia a la glucosa, ya que el cortisol ejerce una acción opuesta a la insulina y el cuadro resultante se asemeja en ciertos aspectos al de la diabetes mellitus. Hay hiperglicemia, el catabolismo protéico está acelerado, y los aminoácidos liberados son convertidos en glucosa o eliminados en la orina, con lo que llega a un balance nitrogenado negativo. Esto se traduce clínicamente en destrucción muscular y osteoporosis (2).

La acción mineralocorticoide del exceso de cortisol es observada en algunos casos. La retención de sodio por los túbulos renales conduce a un aumento de sodio total orgánico con la consiguiente retención de agua. La pérdida de potasio a través del túbulo renal conduce a alcalosis hipocaliémica y puede presentarse supresión del sistema inmune con una notable tendencia a las infecciones, lo que frecuentemente pone en peligro la vida del paciente (2).

Diagnóstico

Cuando un paciente se presenta con rasgos clínicos y la medición de una secreción excesiva de corticosteroides es importante determinar la causa del hipercortisolismo: determinar si la retroalimentación negativa de cortisol sobre la secreción de ACTH es normal, si esta alterada o falta. Una de las pruebas utilizadas para el diagnóstico es la de la "supresión nocturna con dexametasona siguiendo un protocolo de seis días en el cual

la dosis va de 2 mg a 8 mg de dexametasona. La respuesta se evalúa por la medición del cortisol sérico y el cortisol urinario (en orina de 24 hs). La interpretación es: a dosis bajas, la caída del > 50% en el cortisol indica, regulación de ACTH preservada, pero insensible (por lo general Enfermedad de Cushing). Asimismo la determinación de niveles plásmaticos de ACTH paralela a la medición de cortisol nos da información a cerca del origen de hipersecreción, la cual puede ser, ectópica e hipofisaria. La comprobación de la localización tumoral se realiza por TAC a nivel de hipófisis, abdominal y pulmonar cuando se presume origen ectópico (2).

Otra prueba es la determinación del ritmo circadiano, en ella se mide la secreción de cortisol durante 24 hs, tomándose muestras cada 4 hs para la medición de cortisol sérico, observándose si se encuentra alterada la secreción episódica del cortisol, o se mantienen elevados los niveles de cortisol en el transcurso de las 24 hs (pérdida del ritmo circadiano). Esto ocurre en el Síndrome de Cushing (2).

Tratamiento

La adenomectomia transesfenoidal es muy utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Cushing, pero a veces los pequeños tumores corticotróficos son difíciles de localizar en la operación. Si no se encuentra el tumor en la superficie de la glándula, se puede ensayar alguna otra modalidad terapéutica, como irradiación hipofisaria o suprarrenalectomia. El hipo adrenocortisismo post-operatorio es un signo favorable que significa que se han suprimido las células corticotróficas

normales. Los macroadenomas con propagación extraselar son inusuales en la enfermedad de Cushing. La radioterapia (13) convencional de alta energía es eficaz en la enfermedad de Cushing en el 30 - 40% de los adultos, con mejores resultados en niños (13, 54).

5.2.5. Tumores del Gonadotropo y del Tirotrópo

Estos tumores denominados gonadotropomas y tirotrómas o TSHomas, producen gonadotropinas hipofisarias (LH, FSH o ambas) o Tirotrómina (TSH) respectivamente. Son tumores que se han descrito solamente como casos aislados, ya que son menos frecuentes. En ocasiones se desarrollan éstos tumores, como una hiperplasia posterior a períodos prolongados de hipersecreción secundaria, condicionada por la insuficiencia de la glándula blanco (hipogonadismo o hipotiroidismo). En ciertos casos se ha observado la regresión tumoral simplemente después del tratamiento de sustitución con la hormona de la glándula blanco, de modo que es necesario proceder con prudencia antes de instituir la cirugía como terapéutica. Este tipo de tumores hipofisarios frecuentemente secreta solo la cadena alfa de las glicoproteínas sin que se pueda detectar la hormona intacta, casos que se puede descubrir solamente mediante radioinmunoanálisis específico para la subunidad , ya que debido a la falta de la hormona activa la mayoría de las veces no dan manifestaciones clínicas por lo que erróneamente se les clasifica dentro de los adenomas no funcionantes (25, 33, y 52).

5.2.6. Adenomas No Funcionantes o de Células Nulas

Son aquellos que no presentan hipersecreción hormonal característica e incluso cursan con niveles hormonales muy bajos, o normales de ahí su nombre. Generalmente son macroadenomas; las manifestaciones clínicas son neurooftalmológicas debido al tamaño de la masa tumoral, entre ellos es común: dolor de cabeza, disminución del campo visual y síntomas de hipopituitarismo. Algunos estudios histomorfológicos del tejido tumoral de estos pacientes han demostrado gránulos secretorios en la mayoría de éstos adenomas sugiriendo una producción hormonal (1,29).

TABLA 3

CRITERIOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS

DIAGNOSTICO DE ADENOMAS HIPOFISARIOS	
RADIOLOGICO	TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTARIZADA
CLINICO	SINTOMATOLOGIA ALTERACIONES ENDOCRINAS TRASTORNOS VISUALES
LABORATORIO	DETERMINACIONES HORMONALES: FSH, LH, PRL, GH, ACTH. GAST, E2, TEST, Y CORT.

5.3. RADIOINMUNOANÁLISIS

El radioinmunoanálisis (RIA), pertenece a los procedimientos conocidos como inmunoensayos, en los cuales se lleva a cabo la medición específica de una sustancia, en base a la unión de un antígeno (Ag) y un anticuerpo (Ab) aprovechando su inmunoreactividad. Para poder cuantificar esta reacción, existe una amplia variedad de sistemas de detección en los que generalmente el antígeno o el anticuerpo están marcados. En teoría cualquier marcador que permita una medición sensible puede ser utilizado; cuando se marca con un isótopo radiactivo usualmente el ^{125}I el término radioinmunoanálisis (RIA) es aplicado. Alternativamente se usan como marcadores algunas enzimas, entre ellas la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina o la β -galactoxidasa, por lo que se conoce a estos métodos como inmunoenzimáticos cuando las enzimas son los marcadores, unidas al antígeno o al anticuerpo del sistema. La reacción se valora colorimétricamente por la formación de un compuesto cromogénico, a la adición de un sustrato específico a la enzima. Se han usado también, compuestos fluorescentes o quimioluminiscientes, en cuyo caso el ensayo recibe el nombre de fluoroinmunoensayo o inmunoluminiscencia respectivamente; todos ellos han sido ampliamente utilizados en alguna de sus variedades para la medición de numerosos compuestos. Los inmunoensayos han permitido una alta especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y precisión, difícilmente alcanzada por otro tipo de metodología; además por su versatilidad y aplicación general son muy convenientes para la medición de innumerables moléculas de interés biológico. En los sistemas más sensibles como el RIA,

pueden medirse fácilmente cantidades del orden de nanogramos o picogramos de antígeno. El valor potencial de los radioinmunoensayos para propósitos analíticos fue demostrado inicialmente por Berson y Yalow quienes lo aplicaron originalmente a la medición de la insulina, aplicándose después a la determinación de polipéptidos, proteínas, antígenos bacterianos y virales, esteroides, prostaglandinas, drogas y hormonas. En la actualidad los inmunoensayos también han mostrado utilidad para discriminar entre especies de proteínas muy semejantes, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, así como para determinar su concentración, en forma muy específica (9, 10, 59, 60).

Fundamento

El radioinmunoanálisis se basa en un sistema de competencia que se establece entre un antígeno marcado con ^{125}I (Ag^*), y un antígeno sin marcar (Ag) presente en el líquido biológico, compitiendo ambos por ocupar los sitios de unión del anticuerpo (Ab). La cuantificación depende de la habilidad del antígeno no marcado (Ag), para inhibir la unión del antígeno radioactivo (Ag^*) al anticuerpo específico (Ab). Así el antígeno presente en la solución estándar o en la muestra problema ocupa parte de los sitios de unión del anticuerpo, desplazando al Ag^* , de manera inversamente proporcional a su concentración (50).



Generalmente primero se estandariza el procedimiento, de manera que se obtenga la sensibilidad deseada. Para realizar el ensayo,

se utiliza una concentración fija de Ag^* y de Ab incubando el sistema en presencia de las muestras que contienen el estándar (Est) o el antígeno por medir y se incuba para que se lleve a cabo la reacción. En la etapa final del procedimiento la fracción del Ag^* unida al Ab es separada de la fracción residual libre (Ag^*) por un procedimiento adecuado tal como un segundo anticuerpo elaborado contra la globulina del primer anticuerpo del sistema, con el fin de poder precipitar el complejo $Ag - Ab$. En la actualidad es muy común también utilizar un sistema de fase sólida con el Ab unido a las paredes del tubo, con lo que los complejos $Ag - Ab$ y $Ag^* - Ab$ queda en el tubo y basta decantar después de la incubación para eliminar el exceso de Ag^* , finalmente se mide la radiactividad presente en el tubo en un contador de radiaciones gamma. La concentración de Ag en una muestra desconocida es determinada, en la curva estándar o curva de calibración, que se obtiene por la adición de cantidades variables del Ag frío (Est) al sistema de ensayo, a mayor concentración de estándar será menor la incorporación del Ag^* . Como ejemplo representativo se muestra en la fig. 3 la curva estándar de un RIA de la hormona del crecimiento. Un requisito indispensable para el buen funcionamiento del RIA y la exactitud de los resultados, es que el Ag^* y el Ag presentes en la curva de calibración sean inmunológicamente idénticos al Ag presente en la muestra, a fin de que funcione adecuadamente el sistema de competencia.

CURVA ESTANDAR DE GH

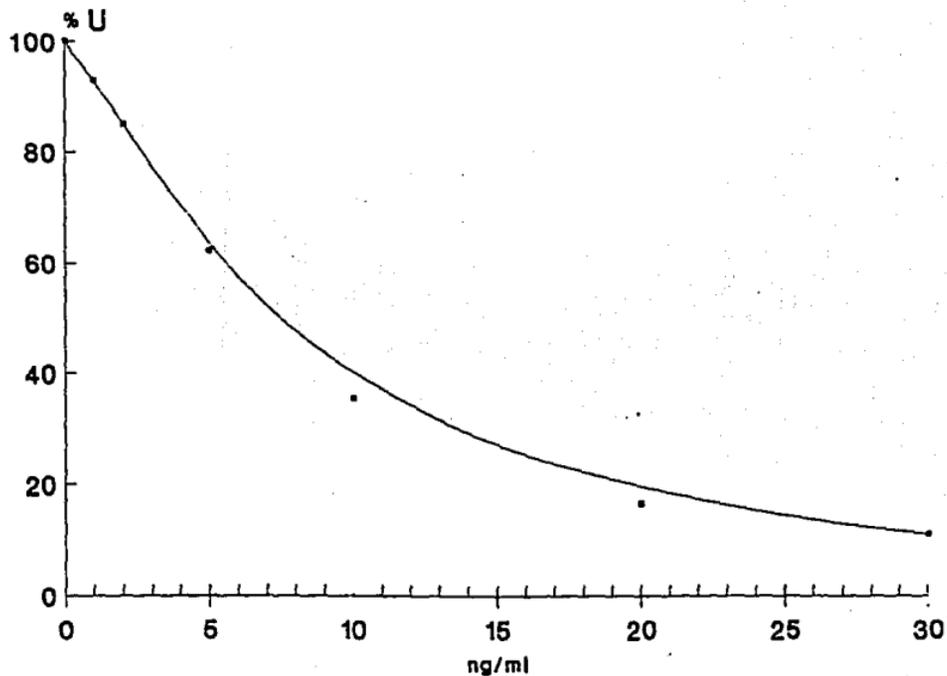


Fig.3 % de unión de GH en función de la concentración

FACTORES QUE DETERMINAN LA CALIDAD DEL RADIOINMUNOANALISIS

- 5.3.1. Naturaleza del anticuerpo y grado de especificidad
- 5.3.2. Actividad específica del antígeno marcado (Ag*)
- 5.3.3. Método para separar las fracciones
- 5.3.4. Sistema de detección de la radiactividad
- 5.3.5. Optimización y estandarización del ensayo
- 5.3.6. Método utilizado para analizar los resultados
- 5.3.7. Validación del ensayo y control de calidad

5.3.1. El Anticuerpo

Los anticuerpos usados en el RIA son por lo general Gamma globulinas (IgGs) proteínas globulares con un peso molecular aproximado de 160,000 daltones (d).

Producción de anticuerpos

Para producir un anticuerpo se requiere un antígeno, el cual por sí mismo o conjugado a una proteína acarreadora, se mezcla con un adyuvante hasta formar una emulsión que se inyecta en animales de laboratorio (conejos, cerdos, ovejas y cabras etc.) por una vía de administración apropiada para desencadenar la respuesta inmune. Después de varias inmunizaciones de refuerzo, el animal es sangrado para obtener el suero que contiene el anticuerpo específico. Diferentes factores deben ser considerados para obtener un buen anticuerpo, con título elevado y adecuada especificidad.

El antígeno usado en la inmunización debe tener un elevado grado de pureza, a fin de obtener anticuerpos con una constante de afinidad elevada, así como evitar la formación de anticuerpos contaminantes. Debe inyectarse una pequeña dosis de antígeno,

seguida por inyecciones de refuerzo a intervalos de una a dos semanas, durante diez semanas y después una inyección mensual. Para mejores resultados las inmunizaciones generalmente son hechas por vía subcutánea, con aplicación en sitios múltiples. Usando ésta técnica es probable obtener un buen antisuero con adecuada especificidad y con una constante de afinidad de 10^{-9} a 10^{-12} M., después de varios meses de la primera inmunización. Los compuestos con un peso molecular menor de 10,000 (d) no son inmunogénicos, por lo tanto el antígeno debe ser acoplado a una proteína o a un polisacárido pesado, a fin de desencadenar la respuesta inmune. Tal es el caso de las catecolaminas y los esteroides, que generalmente se unen a proteínas como la albumina bovina (BSA), la lisozima o la hemoglobina, con objeto de poder obtener anticuerpos contra tales haptenos (10,42 y 55).

Caracterización de los Anticuerpos

Una vez producidos los anticuerpos, deben ser probados para determinar su calidad, debiéndose evaluar:

- a) Su afinidad por el antígeno
 - b) La especificidad frente a moléculas estructuralmente relacionadas
 - c) El título y la concentración a utilizar en el RIA
-
- a) Constante de afinidad del anticuerpo (K_a)

Puede ser evaluada de acuerdo al método de Scatchard a partir de los datos de la curva estandar, graficando el valor de la relación unido/libre, contra la fracción unida, de acuerdo a

la ley de "acción de masas", mediante el siguiente razonamiento:

$$\text{Ag} + \text{Ab} \xrightleftharpoons{K_1} \text{Ag} - \text{Ab} \quad (1)$$

$$K_2$$

$$K_a = K_1/K_2 \quad (2)$$

$$K_a = (\text{Ag} - \text{Ab}) / (\text{Ag})(\text{Ab}) \quad (3)$$

$$K_a(\text{Ab}) = (\text{Ag} - \text{Ab}) / (\text{Ag}) \quad (4)$$

$$\text{Considerando que } U/L = (\text{Ag} - \text{Ab}) / (\text{Ag}) \quad (5)$$

$$U/L = K_a (\text{Ab}) \quad (6)$$

En el sistema de RIA la concentración del Ab es constante

$$(\text{Ab}) = K$$

y por definición:

$$(\text{Abo}) = (\text{Ab}) + (\text{Ag}-\text{Ab})$$

donde $(\text{Abo}) = \text{Concentración inicial de Ab} = K$

$$U/L = K_a (\text{Ab}) = K_a(\text{Abo}) - K_a(\text{Ag} - \text{Ab}) = K_a (\text{Abo}) - K_a U$$

Asumiendo que el anticuerpo es homogéneo y que se encuentra en una concentración inicial constante $(\text{Abo} = K)$ en presencia de cantidades variables de antígeno, si se grafica la relación U/L vs U se obtendrá una línea recta en la que el valor relativo de la pendiente (m) corresponde a la constante de afinidad $(m = -K_a)$ (15).

En realidad los anticuerpos policlonales no son homogéneos contienen varias poblaciones de anticuerpos, cada uno con

una K_a diferente, de manera que lo que se obtiene en la gráfica, es un promedio de la constante de afinidad de todos estos anticuerpos. El intercepto en el eje horizontal a su vez corresponde a la concentración total del Ab en el sistema (Fig. 4).

- b) La especificidad en el RIA esta dada por la capacidad del Ab para reconocer en forma exclusiva el antígeno contra el que fue producido. Se determina probando en el radioinmunoensayo, compuestos de estructura muy similar al antígeno a ser medido. En el caso de ser reconocidos, desplazarán al Ag^* de su unión al anticuerpo, mediante una reacción cruzada que se valora comparando la concentración necesaria de antígeno específico (Est) y de las sustancias estructuralmente semejantes, para producir un 50% de inhibición en dicha unión, expresando la potencia del material probado como un porcentaje de la potencia obtenida para el estandar. Si el antisuero es suficientemente específico el % de reacción cruzada será muy bajo, como en el ejemplo que se presenta a continuación que corresponde al estudio de especificidad de un antisuero para la hormona de crecimiento (GH) frente a otras hormonas hipofisarias.

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD
(SCATCHARD)

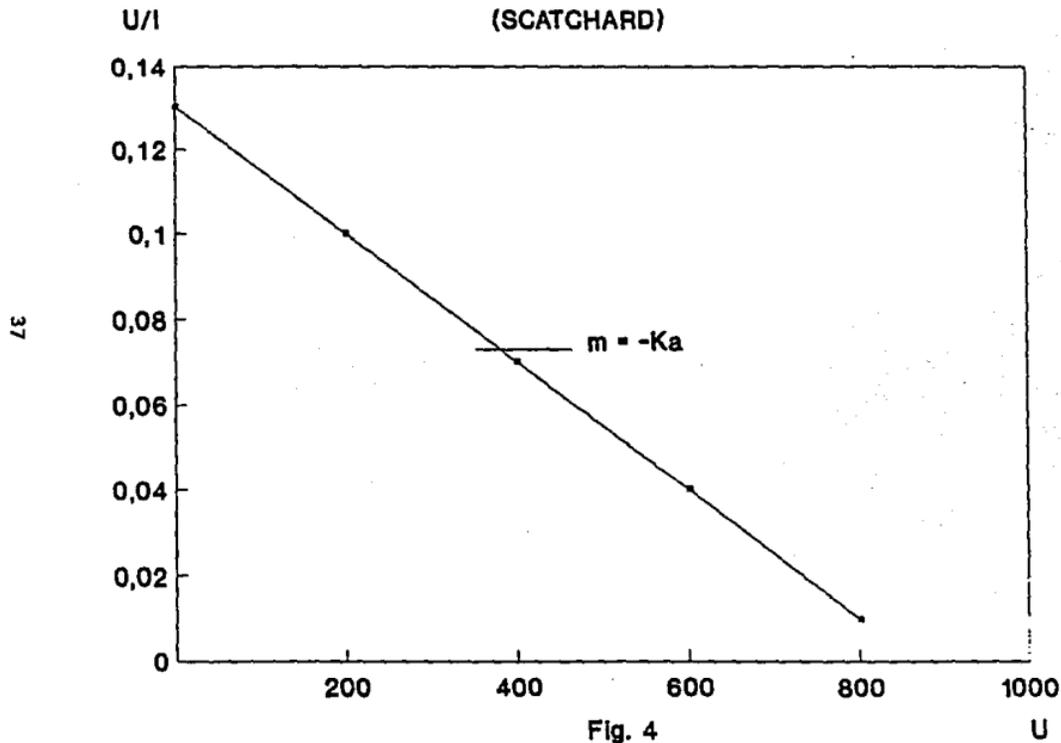


Tabla 4. Estudio de especificidad de un antisuero para la hormona
de crecimiento ante otras hormonas hipofisarias

HORMONA	% REACCION CRUZADA
Hormona del crecimiento	100.00%
Prolactina	0.10
Hormona foliculoestimulante	0.05
Hormona luteinizante	0.02
Gonadotrofina coriónica	0.02
Hormona estimulante de tiroides	0.01

c) El título a utilizar en el RIA puede ser estimado a una concentración constante de Ag^* determinando la concentración de Ab que une 50 % del Ag^* del sistema, es decir, aquella concentración de Ab que proporcione una relación unido/libre igual a 1.0, lo cual estará en función de la dilución del anticuerpo; generalmente se obtiene una curva como la que se muestra en la Fig. 5. Además de permitir evaluar la concentración a utilizar en el RIA, la pendiente de la parte lineal de la curva es indicativa de la afinidad del anticuerpo y da una idea de la sensibilidad que puede ser obtenida en el ensayo.

5.3.2. Antígeno Marcado (Ag^*)

El antígeno radiactivo utilizado en el RIA debe llenar varios requisitos respecto a: su actividad específica, vida media y estabilidad biológica e inmunoquímica. Idealmente el Ag^* debe tener una elevada actividad específica, necesaria para obtener un máximo de sensibilidad en el conteo. Su vida media debe ser lo suficientemente larga para que pueda utilizarse un tiempo razonable. Desafortunadamente, la actividad específica y la vida media están inversamente relacionados y son pocos los radionúclidos que tienen una actividad adecuada para la sensibilidad necesaria en el sistema, con una vida media suficientemente larga, a la vez que sea un isótopo seguro para su manejo en el laboratorio. Estas características se encuentran en el ^{125}I , uno de los radioisótopos (emisor γ) más ampliamente utilizados en el RIA; tiene una vida media de 60 días, lo que permite usarlo durante dos meses aproximadamente. Otro

TITULACION DEL ANTICUERPO

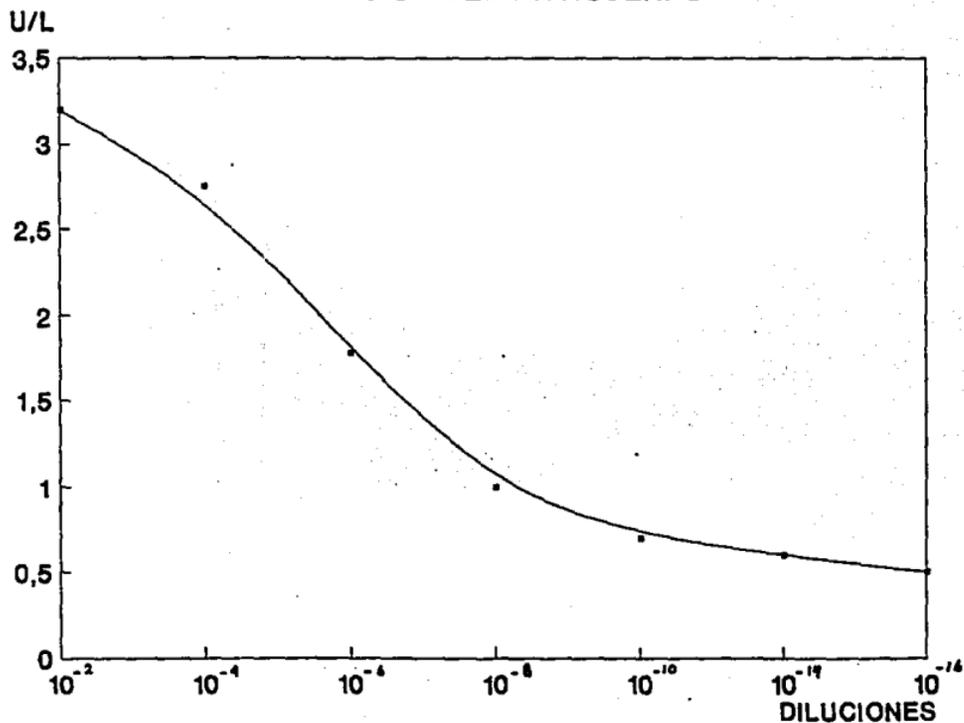


Fig.5

radionúclido usado en el RIA por las características de emisión (B) y vida media larga (12.2 años) es el Tritio (H^3) que ha sido muy utilizado para marcar hormonas esteroides. Sin embargo, a la fecha el ^{125}I es el isótopo más comunmente utilizado, tanto en el RIA de esteroides como de hormonas protéicas (4).

METODOS DE MARCAJE

La técnica más utilizada para marcar proteínas es la reacción de iodinación, introduciendo el ^{125}I a la molécula, a nivel de la tirosina o algún otro aminoácido como la fenil alanina o histidina. El ^{125}I - puede ser incorporado por diferentes métodos:

1) Método Oxidativo

Es un método de iodinación descrito por Greenwood y Hunter en 1970 que utiliza la Cloramina T, para convertir el $^{125}I NaI$ a Iodo libre (I_2) o a radicales con una carga positiva (I^+), especies muy reactivas que interaccionan con la tirosina para formar un derivado monoiodinado, pudiéndose formar un derivado diiodinado cuando la actividad específica es muy alta; sin embargo, esto no es deseable, porque puede dañarse la proteína y perder parte de su actividad biológica (23).

El método es simple, rápido, y altamente eficiente en la incorporación del Iodo a la proteína, sin embargo, debe controlarse cuidadosamente la concentración de la cloramina T y el tiempo de reacción, ya que si se prolonga pueden oxidarse los grupos sulfihidrilo, imidazol, indol y otros, causando desnaturalización de la proteína. Esto se evita añadiendo un reductor generalmente m - bisulfito de sodio para

detener la reacción después de 30" o un minuto (23).

2) Método Enzimático

Es un procedimiento que utiliza lactoperoxidasa y peróxido de hidrógeno para la reacción de oxidación. Con este método no se expone a la proteína a concentraciones elevadas de oxidante, ni se libera Iodo libre (I_2) por lo que la degradación y desnaturalización del antígeno es menos probable, obteniéndose compuestos iodados de excelente calidad. Una variación a este procedimiento incluye la adición en fase sólida de la lactoperoxidasa, por lo que puede ser retirada fácilmente después de efectuada la reacción, por simple decantación (53).

3) Iodinación Electrolytica

Aunque fue descrita desde hace años, es poco utilizada en la práctica por requerir tiempos muy largos para el marcaje y grandes cantidades de los reactivos, solo se utiliza a nivel industrial. Una vez iodada la proteína, el antígeno marcado (Ag^*) que se obtiene debe ser purificado por algún procedimiento tal como: la cromatografía, filtración en gel o electroforesis, a fin de separarlo de la mezcla de la reacción, tenerlo puro y que sea adecuado para el RIA (28,47).

5.3.3. Método de Separación

Como ya se mencionó anteriormente, una vez efectuada la incubación del sistema de RIA, es necesario contar con un método de separación adecuado para separar el Ag^* libre que ha quedado sin reaccionar, de la fracción unida al anticuerpo ($Ag^* - Ab$). Uno de los métodos más usados consiste en precipitar el complejo $Ag^* - Ab$, o bien el Ag^* libre y separarlos después por centrifugación.

Para la precipitación del complejo Ag-Ab mediante el uso de un segundo anticuerpo (2o.Ab), elaborado contra la gammaglobulina del primer anticuerpo. Se agrega este después que se ha llevado a cabo la incubación para la formación del complejo Ag-Ab. Así el segundo Ab se une específicamente a la globulina del primer Ab, precipitando el complejo, durante una segunda incubación fig. 6, posteriormente se centrifuga y se decanta para eliminar el exceso de Ag⁺ libre y poder contar la radiactividad presente en el precipitado. Este método es el más utilizado en los estuches comerciales o simplemente la decantación cuando se utiliza un RIA de fase sólida.

5.3.4. Detección de la Radiactividad

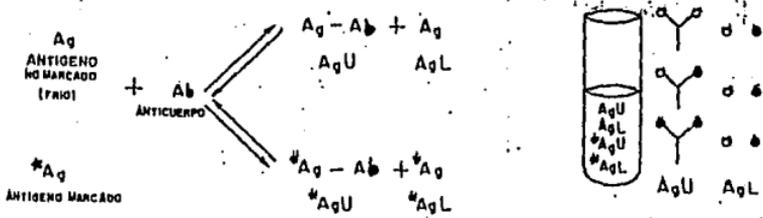
La detección del material radioactivo presente en los tubos del ensayo requiere equipos especiales para la detección de la radiactividad, como son los contadores para emisiones Gamma o Beta (α , β).

Los contadores Gamma son los más utilizados en el radioinmunoanálisis de rutina, ya que los radioisótopos usados en el marcaje del Ag o Ab son emisores gamma, como el ^{125}I o el ^{131}I . En la investigación se utilizan generalmente contadores de emisiones Beta o ambos (α , β).

El contador a utilizar depende de algunos factores como son:

1. Campo de aplicación del contador ya sea para la rutina o la investigación, pudiendo elegirse un contador de centelleo líquido o de cristales de NaI.
2. Contador manual o automático. En la actualidad existen contadores totalmente automatizados que tienen una computadora

1a. Etapa



2a. Etapa

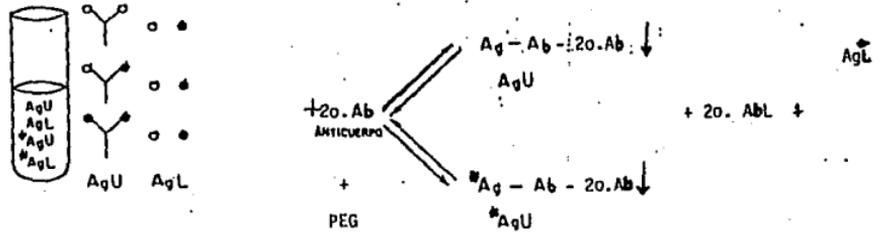


FIGURA 6. Método de separación.

en la que se programa el ensayo, la cual calcula la dosis de la muestra problema, en base a la curva de calibración.

3. Número de las muestras. Estas van de 100 a 500 muestras o más de acuerdo a la capacidad del laboratorio, siendo importante considerar el tiempo de tránsito entre una muestra y otra (aproximadamente de 30 seg.) y el tiempo de conteo de cada tubo o vial (de 1 a 5 min.). En la rutina es de 1 minuto como promedio.
4. Con un sólo detector o con detectores múltiples. Esto es de acuerdo a las necesidades de cada laboratorio. Los equipos con detectores múltiples se utilizan sólo en aquellos laboratorios con una carga de trabajo muy importante (21).

PARTES ESENCIALES DE UN CONTADOR

1. Centelleador

Es un material, el cual emite una luz o centelleo (flasheo intermitente) cuando lo atraviesa la radiación ionizante; la intensidad del centelleo varía con la energía de radiación emitida.

2. Fotomultiplicador

La luz emitida por el centelleador es captada por un tubo fotomultiplicador, el cual convierte los fotones en pulsos electrónicos; la amplitud de estos pulsos es proporcional a la intensidad de centelleo y esto nos indica la energía de radiación emitida.

3. Circuitos Electrónicos

Estos captan los pulsos electrónicos del fotomultiplicador y los traducen en cpm para cada vial (ya sea de la curva

estandar o de las muestras problema) (21).

5.3.5. Optimización y Estandarización del Ensayo

Otros factores importantes a considerar para estandarizar el ensayo y tener un buen radioinmunoanálisis son: El pH, el tiempo y la temperatura de incubación, así como el volúmen final al que se realiza el ensayo. De los amortiguadores utilizados en el sistema los más importantes son: amortiguadores de fosfatos, boratos y Tris-salino a un pH cercano a la neutralidad (7.0 a 7.4), con una fuerza iónica adecuada para la formación del complejo (0.01-0.1 M). La temperatura a la que se realiza la reacción con mejores resultados es a temperatura ambiente o a 4° C, una variación consiste en incubar a una temperatura de 37° C, 1-2 horas y después continuar la incubación en frío a una temperatura de 4° C por 6-18 horas más. Respecto al tiempo de incubación, se ha observado, que se obtiene el equilibrio de la reacción y se eleva la sensibilidad, cuando se incuba por 24 horas. Tiempos cortos de incubación no son muy recomendables, porque no se alcanza el equilibrio de la reacción Ag-Ab. También dependiendo las condiciones de equilibrio o no equilibrio de la reacción, el Ag* puede ser adicionado al mismo tiempo que la muestra o posteriormente. Sin embargo, cuando se necesita incrementar la sensibilidad, es recomendable preincubar el Ag con el anticuerpo antes de adicionar el Ag* (39).

5.3.6. Análisis de los Resultados de RIA.

En el RIA la curva dosis - respuesta (curva estándar) representa la relación entre el grado de unión de la hormona marcada (Ag*) con el anticuerpo (Ab) en función de la concentración de la

hormona en el estandar.

Existen diferentes métodos de analizar los datos de la curva dosis - respuesta, los más utilizados son los siguientes:

- a) Porcentaje de unión de la hormona radiactiva unida al anticuerpo ($\%U$) vs la concentración del estándar, (en escala aritmética o logarítmica). Donde el $\%U$ es igual a la radiactividad unida entre la unión total (CT).
- b) Relación de la fracción unida y la fracción libre (u/L) vs la concentración del estándar (en escala aritmética o logarítmica).
- c) Relación de la fracción libre entre la fracción unida (L/U) contra la concentración del estandar (en escala aritmética o logarítmica).
- d) Relación entre la fracción unida y la unión total o radiactividad unida al anticuerpo en ausencia del estándar (U/Uo) vs la concentración del estándar (en escala aritmética o logarítmica).
- e) Transformación logit-log. Logaritmo de U/Uo vs logaritmo natural o decimal de la concentración del estándar.

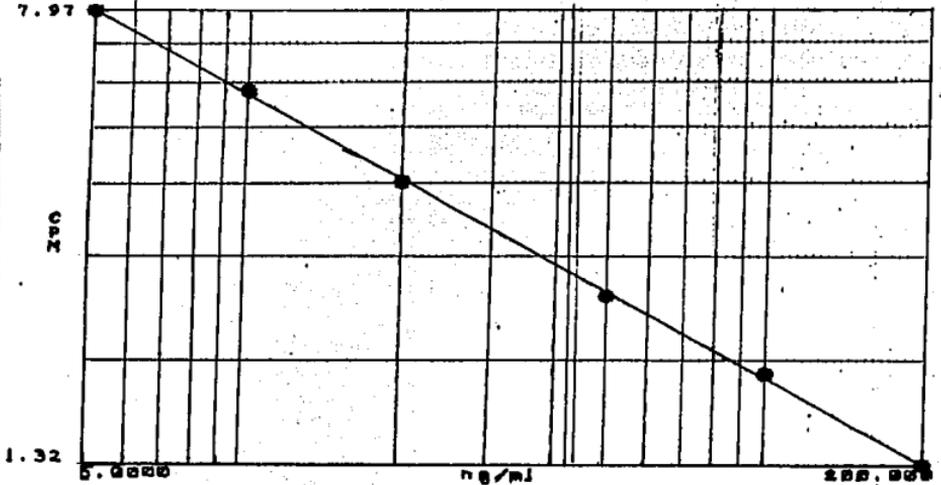
La más utilizada es la transformación Logit-log introducida por Rodbard, porque suprime la posibilidad de la influencia personal al trazar la curva dosis - respuesta y al calcular la concentración de las muestras desconocidas, ya que al obtener una línea recta facilita la obtención de los resultados del análisis (Fig. 7).

Logit implica el logaritmo natural (Ln) de:

$\text{Ln } \frac{U}{100 - U}$ en la recta equivale al valor de Y (eje de las ordenadas) log implica el logaritmo decimal de la concentración

ASSAY TYPE: RIA
 (x1000)
 7.97

CPM BOUND



STD #	cpm	DEFINED DOSE	%B/F	CALC DOSE
1	7967	5.0		5.02
2	6786	10.0		9.66
3	5103	20.0		20.54
4	3121	50.0		51.53
5	2105	100.0		96.56
6	1324	200.0		201.15

CURVE FIT: LOGIT
 COOR. COEF: 0.9998
 DETLIMIT: 5.0
 %NSB/TOTAL: 1.3884
 ED 20: 82.927
 INTERCEPT: 2.8792

TRANSFORM X: LOG
 ED 50: 19.73

TRANSFORM Y: LOGIT
 SLOPE: -2.2231
 PARA COEF.: 0.9999
 %REF/TOTAL: 33.066
 ED 80: OFF CURVE

FIG. 7 METODO LOGIT - LOG RIA DE PROLACTINA

del antígeno y en la recta equivale al valor de X (eje de las abscisas).

Aplicando la ecuación de la recta por regresión lineal se puede obtener el valor de la pendiente (b) y el intercepto al origen (a).

El valor de la pendiente (b) es teóricamente una constante que es igual a -2.303 en circunstancias ideales, esto es cuando la hormona fría y la hormona marcada poseen la misma afinidad por el anticuerpo y cuando el sistema se encuentra en equilibrio.

En la práctica se aceptan valores de -2.303 +0.156. La reproducibilidad del valor de la pendiente en una serie de ensayos es un parámetro importante en el control de calidad del RIA (45,46).

5.3.7. Validación del Ensayo y Control de Calidad en el RIA de hormonas

En el laboratorio se debe evaluar continuamente la calidad y confiabilidad de los procedimientos analíticos cuantitativos. Por consiguiente la introducción de sistemas de control de calidad en forma rutinaria es esencial para asegurar que el método aplicado es el adecuado y que los resultados reflejan verdaderamente la concentración del analito cuantificado.

El control de calidad en el RIA permite un análisis crítico de los resultados a corto y a largo plazo, permitiendo la realización de análisis que reúnan todos los criterios de confiabilidad. En un período corto, señalando ocasionalmente la necesidad de rechazar valores individuales o un análisis completo y a largo plazo permitiendo valorar la precisión y la reproducibilidad del método, facilitando la detección de los

factores de error.

Criterios de Confiabilidad

Idealmente un RIA es confiable si los resultados expresan el valor real de la muestra, con una precisión aceptable, dentro de los límites del error experimental. En la práctica, la situación ideal nunca ocurre, ya que la variabilidad es inherente a toda medición y los valores obtenidos siempre se encuentran dispersos alrededor de la media aritmética del valor real.

Los criterios de confiabilidad del RIA de hormonas incluyen:

- 1. Especificidad**
- 2. Precisión**
- 3. Reproducibilidad**
- 4. Sensibilidad**
- 5. Exactitud**

1. La especificidad de un RIA puede definirse como el reconocimiento exclusivo de la estructura de la hormona que desea cuantificarse, sin interferencia de estructuras análogas u otras sustancias presentes en la muestra.
2. La precisión de un análisis puede definirse como el grado de variación en la cuantificación repetida de una misma muestra. Generalmente los valores obtenidos se distribuyen alrededor de la media aritmética y no deben exceder de + 2 DE. La precisión en la preparación de la curva dosis - respuesta es fundamental para alcanzar un alto grado de exactitud y para ello la hormona debe tener un elevado grado de pureza y ser

inmunoquímicamente idéntica a la hormona marcada y a la hormona presente en la muestra biológica, lo cual es indispensable para la validación del ensayo; debiendo obtenerse también el perfil de precisión de la curva de calibración, para lo cual se grafica el coeficiente de variación de cada una de las dosis contra la respectiva concentración (Fig. 8).

3. La reproducibilidad implica que el resultado obtenido en una muestra dada, se reproduzca en cuantificaciones repetidas a lo largo de diversos análisis.

La precisión y la reproducibilidad de un método están íntimamente ligadas entre sí y son la imagen inversa de los errores cometidos en el transcurso de un ensayo. Si el error es pequeño, la precisión y la reproducibilidad serán elevadas y viceversa. Estos criterios de confiabilidad se expresan en términos de dispersión dentro de un análisis (variación intra-análisis) y entre un número de análisis (variación inter-análisis) dentro de un programa de control de calidad interno.

4. Por otro lado la precisión de la curva dosis-respuesta en particular al nivel de la unión total o unión máxima en ausencia de estándar (U_0), es sumamente importante ya que permite establecer la sensibilidad del análisis; que se define como la mínima dosis detectable que es significativamente diferente del cero de concentración permitiendo además distinguir una dosis de otra.
5. La exactitud de un RIA puede definirse como el grado de acercamiento entre el valor obtenido y la concentración real en la muestra. Este criterio es altamente dependiente de la

CV

PERFIL DE PRECISION

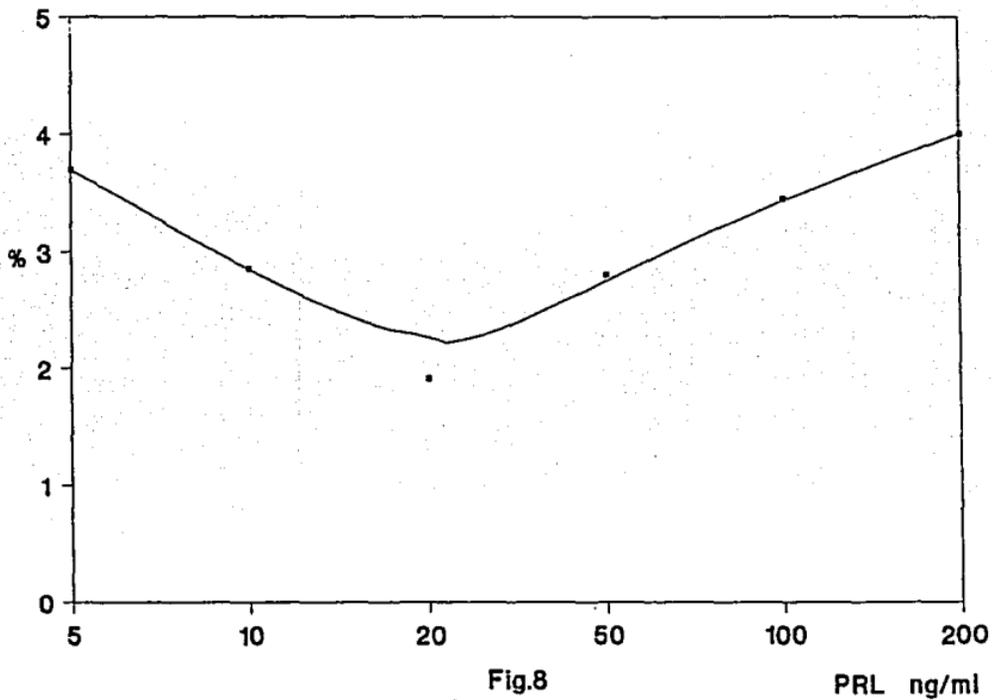


Fig.8

PRL ng/ml

especificidad del anticuerpo. La precisión y la exactitud están íntimamente ligadas por lo que pueden obtenerse análisis precisos y exactos, análisis precisos e inexactos, análisis exactos e imprecisos y análisis sin precisión y sin exactitud.

Otros factores a considerar para la validación de los inmunoensayos son:

1. Estudios de Paralelismo

Se realizan valorando un sistema de ensayo en comparación a otro considerado como método de referencia generalmente con un principio diferente de medición (ejemplo: método inmunoenzimático vs RIA).

2. El uso de estándares internos de concentración conocida; muy utilizado para evaluar la exactitud.

3. Estudio de especificidad mediante el uso de compuestos semejantes al antígeno a determinar, que pudieran ser reconocidos por el anticuerpo, mediante una reacción cruzada, la cual de existir debe ser muy baja, a fin de asegurar la especificidad del ensayo.

4. La estabilidad del antígeno radiactivo, el cual no debe estar degradado o deiodinado para lo cual debe ser utilizado lo más cercano posible a la fecha de iodinación.

Además es deseable tener un intercambio de muestras entre diferentes laboratorios utilizando la misma metodología, es decir, participar en algún programa de Control de Calidad Externo.

La combinación y aplicación de estos criterios dará mayor confiabilidad a los resultados, que un sólo criterio.

6.0. MATERIAL Y METODO

6.1 MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

- Contador de radiaciones Gamma, marca Packard, modelo Cobra I
- Centrifuga refrigerada, marca Sorvall, modelo RC-3 con alcance de 6,000 rpm, a una temperatura de 4° C
- Mezclador vortex, Super Mixer Lab-Line Instruments, Inc.
- Microjeringas Hamilton de 100 ul y 500 ul
- Agitador magnético (Precision Scientific)
- Barra magnética
- Baño para incubación a 37° C (Precision Scientific Chicago USA)
- Refrigerador Kelvinator Standard (4-6° C)
- Congelador American, Refrigeration Products, S. A. de C.V. (-20° C)
- Tubos de polipropileno de 12x75 mm
- Gradillas de acrílico con capacidad para 100 a 150 tubos
- Vasos de precipitado de 100 y 250 ml
- Recipiente de plástico para decantar el sobrenadante radiactivo
- Gradillas metálicas con capacidad para 90 tubos de 13x100 mm

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se recolectaron muestras de sangre de 149 pacientes con diagnóstico de adenomas hipofisarios. Fueron tomadas de 7:00 a 8:00 am. en ayunas, separando el suero y alicuotándolo en fracciones de 500 ul. cantidad suficiente para cada determinación hormonal, almacenándose a -20° C hasta su procesamiento. Los sueros se clasificaron de acuerdo al diagnóstico clínico del paciente en los siguientes grupos:

PROLACTINOMA

ACROMEGALIA

SINDROME DE CUSHING

ADENOMAS MIXTOS

ADENOMAS NO FUNCIONANTES

Tomándose muestra a 20 personas normales para establecer la diferencia entre un sujeto normal y aquel que padece la enfermedad, siguiéndose las mismas indicaciones en la toma de muestra que para los adenomas.

Características de la población normal

Mujeres en edad reproductiva 8, con las siguientes características: edad de 20 a 30 años, con 1-3 gestaciones, sin trastornos menstruales, sin alteraciones neurológicas ni oftálmicas.

Hombres en edad reproductiva 12, con las siguientes características: edad de 25-40 años, con paternidad demostrada, sin alteraciones neurológicas ni oftálmicas.

Para el diagnóstico de Enfermedad de Cushing se tomaron además de

una muestra basal otras muestras para determinar el ritmo circadiano de cortisol a las 8, 12, 16, 20, 24 y 4 horas a 3 pacientes con esta enfermedad, tomándose las mismas muestras en dos individuos sanos.

La prueba de supresión con dexametasona es útil para establecer este diagnóstico. consistiendo en: la administración de dosis de 2 mg de dexametasona y 8 mg de dexametasona, para evaluar la supresión del hipercortisolismo. Para lo cual se tomaron muestras posteriores a la administración de las dosis.

En la acromegalia además de la determinación basal de la GH, se realizó la cuantificación de la hormona a los 30, 60, 120 y 180 min. después de una ingesta de 75 g de glucosa por vía oral (prueba de tolerancia a la glucosa) en 7 pacientes con este diagnóstico.

6.3. METODO

METODO

TABLA 5 DETERMINACIONES HORMONALES PARA RADIOINMUNOANALISIS

TIPO DE SIST.	HORMONA	CASA COMERCIAL
D	ACTH	CIS BIO INTERNATIONAL REF: ACTH K-PR
O	LH	CLINICAL ASSAYS REF. GAMMA DAB (1125) LH RIA KIT
B	FSH	CLINICAL ASSAYS REF. GAMMA DAB (1125) FSH RIA KIT
L	PRL	DIAGNOSTIC PRODUCTS CORP. REF: PROLACTIN DOUBLE ANTIBODY
E	GH	DIAGNOSTIC PRODUCTS CORP. HGH DOUBLE ANTIBODY
	E ₂	CIS BIO INTERNATIONAL REF: SB-ESTR.
A	TEST	CIS BIO INTERNATIONAL REF: SB-TESTO
b	GAST	CIS BIO INTERNATIONAL REF: GASK - PR
SISTEMA DE FASE SOLIDA		CIS BIO INTERNATIONAL REF: CORT - CT

TABLA 6 PROTOCOLO GENERAL DEL RIA DE DOBLE ANTICUERPO

TUBOS	ESTÁNDARES	PROBLEMAS	Ag	Ab		Reacc. p.p. (2o. Ab)		Conteo
C.T.			X ul		Mezclar e Incubar a T. A. a 37° C Tiempo, Minutos u Horas		Mezclar e Incubar a T. A.	de emisiones
Blanco			X ul			1 ml		
Estándares	X ul		X ul	X ul		1 ml	Centrifugar 30' a 4° C	Gamma
Muestras		X ul	X ul	ul		1 ml	Decantar y secar	cpm

X = Volumen Variable en los diferentes radioinmunoanálisis

TA= Temperatura Ambiente

CT= Cuentas Totales

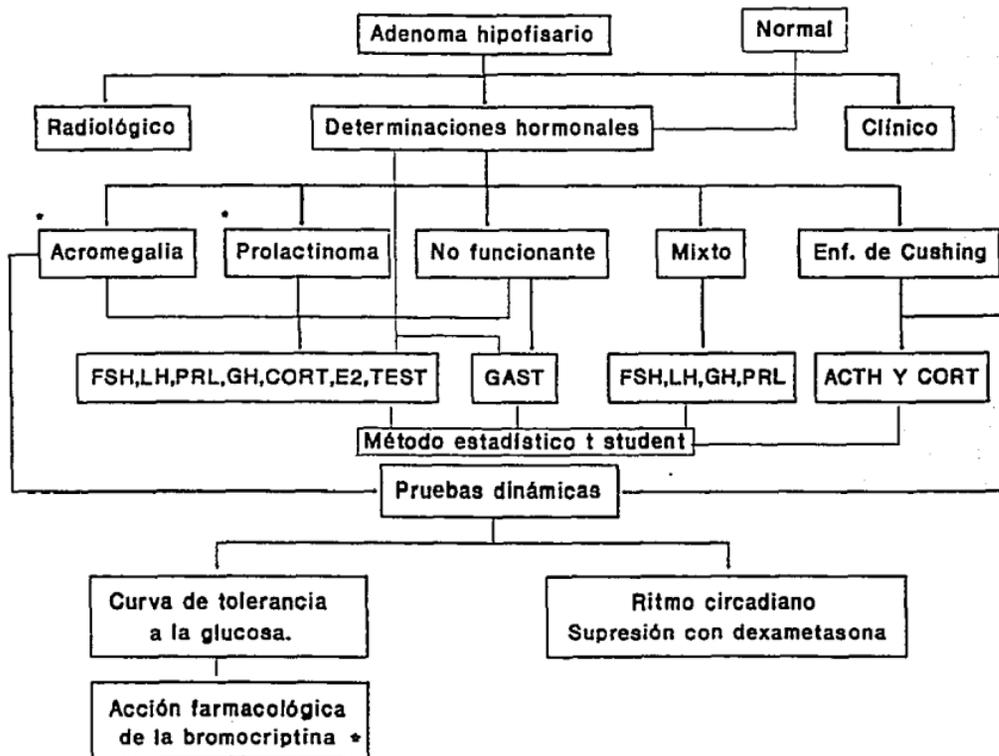
TABLA 7 PROTOCOLO GENERAL DE RIA DE FASE SOLIDA

Tubos con el Ab	Estándares	Problemas	Ag*	Mezclar e Incubar Temperatura 37° C Tiempo (hr)	Decantar Y Conteo de emisiones Gamma cpa
C.T.			X ml		
Blanco Tubos/Ab			X ml		
Estándares	X ul		X ml		
Muestras		X ul	X ml		

X= Volumen variable en los diferentes Radioinmuno análisis

CT= Cuentas Totales

FIG. 9 DIAGRAMA DE FLUJO



7.0 RESULTADOS

7.1 FRECUENCIA DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS

Considerando un total de 149 adenomas hipofisarios estudiados tabla 8, mediante las determinaciones hormonales realizadas a cada paciente y por cifras elevadas de PRL, GH o cortisol. Se pudo determinar la frecuencia de presentación del prolactinoma 48%, la acromegalia 22%, la enfermedad de Cushing 9% respectivamente, así como del adenoma no funcionante 15%, cuando no se encontró una hipersecreción hormonal característica o del adenoma mixto 6% cuando se encontró una hipersecreción de dos hormonas GH y PRL figura 10.

En la tabla 8 se muestra una mayor frecuencia de aparición de los adenomas: en mujeres 92 casos y en hombres 57 casos.

Así como una mayor incidencia de prolactinoma en mujeres se presentaron 49 casos y en hombres 23; en la acromegalia en el hombre se presentó con mayor frecuencia 18 casos y en la mujer 15, en la enfermedad de Cushing el predominio de presentación fue en la mujer 12 casos y en el hombre 1 sólo caso, en el adenoma no funcionante la aparición fue similar tanto en la mujer 10 casos como en el hombre 12 casos y finalmente en el adenoma mixto predominó su aparición en la mujer 6 casos y 3 casos en el hombre.

Tabla.8 FRECUENCIA DE LOS DIFERENTES ADENOMAS HIPOFISARIOS.

TIPO DE ADENOMA	MUJERES	HOMBRES	TOTAL	FRECUENCIA
PROLACTINOMA	49	23	72	48 %
ACROMEGALIA	15	18	33	22 %
E. DE CUSHING	12	1	13	9 %
NO FUNCIONANTE	10	12	22	15 %
MIXTO	6	3	9	6 %
TOTAL	92	57	149	100 %

FRECUENCIA DE APARICION DE LOS DIFERENTES ADENOMAS

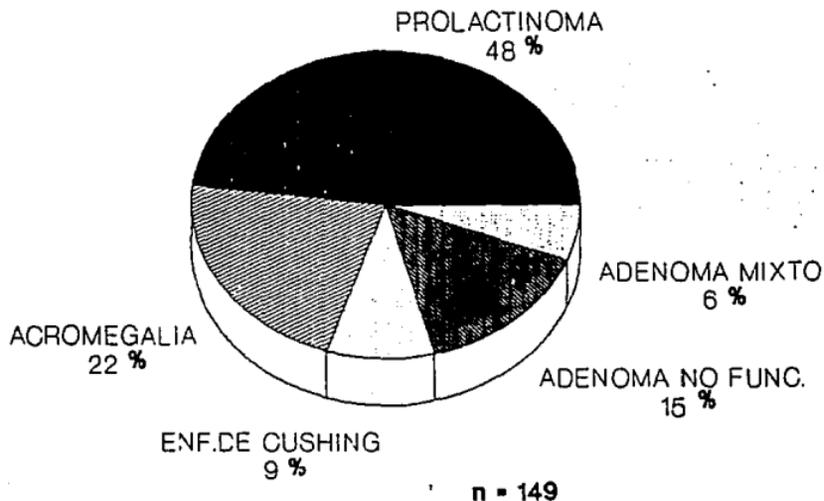


Fig. 10

7.2 FRECUENCIA DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS POR EDAD

7.2.1. Prolactinoma

Como puede verse en la figura 11 la mayor frecuencia de aparición del prolactinoma en mujeres fue en la cuarta década de la vida. En cambio en los hombres figura 12 la mayor frecuencia se presentó en quinta década con una frecuencia variable en las demás décadas para ambos sexos.

7.2.2. Acromegalia

La figura 13 presenta la frecuencia de aparición de la acromegalia en mujeres, la mayor frecuencia ocurrió en la tercera década de la vida aunque en la quinta y sexta década se presentó con una frecuencia importante. En hombres figura 14 la más alta incidencia fue en la quinta década, siguiendo en orden de importancia la tercera y cuarta décadas.

7.2.3 Enfermedad de Cushing

Como se observa en la figura 15 en las mujeres esta enfermedad se presentó con mayor frecuencia en la tercera década de la vida, con una frecuencia importante en la segunda década y en hombres sólo se encontró un caso en la segunda década de la vida.

7.2.4 Adenomas No Funcionantes

La figura 16 muestra que la mayor frecuencia de éste adenoma en las mujeres se presentó en la tercera década de la vida después en la quinta y la sexta década. En hombres figura 17 la mayor frecuencia se encontró en la cuarta y quinta década.

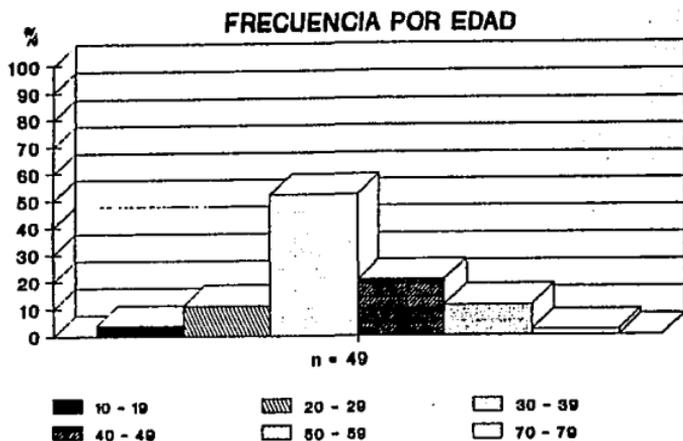


Fig.11 Frecuencia de aparición de prolactinoma en mujeres

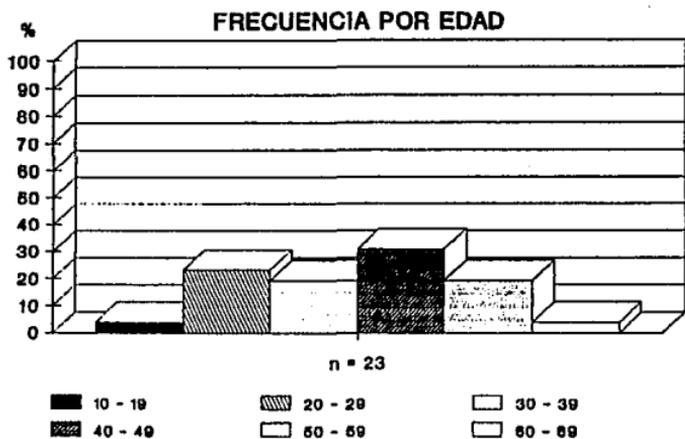


Fig.12 Frecuencia de aparición de prolactinoma en hombres.

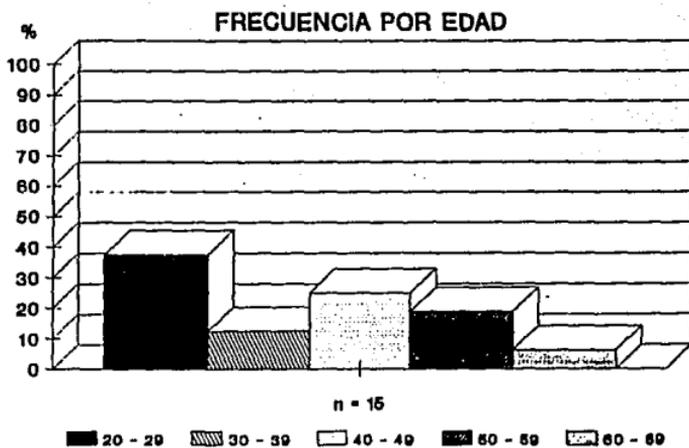


Fig.13 Frecuencia de aparición de acromegalia en mujeres

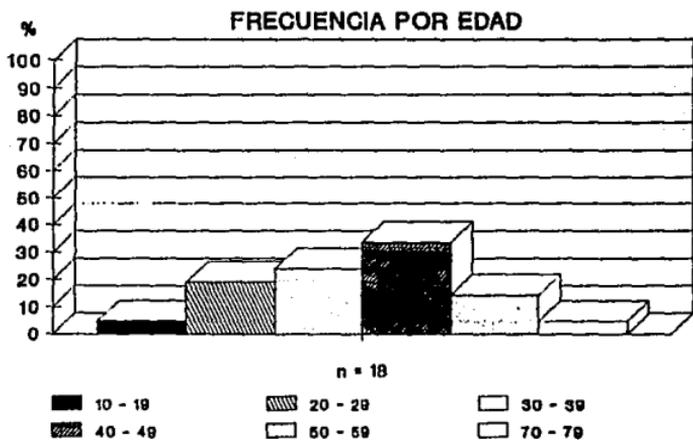


Fig.14 Frecuencia de aparición de acromegalia en hombres.

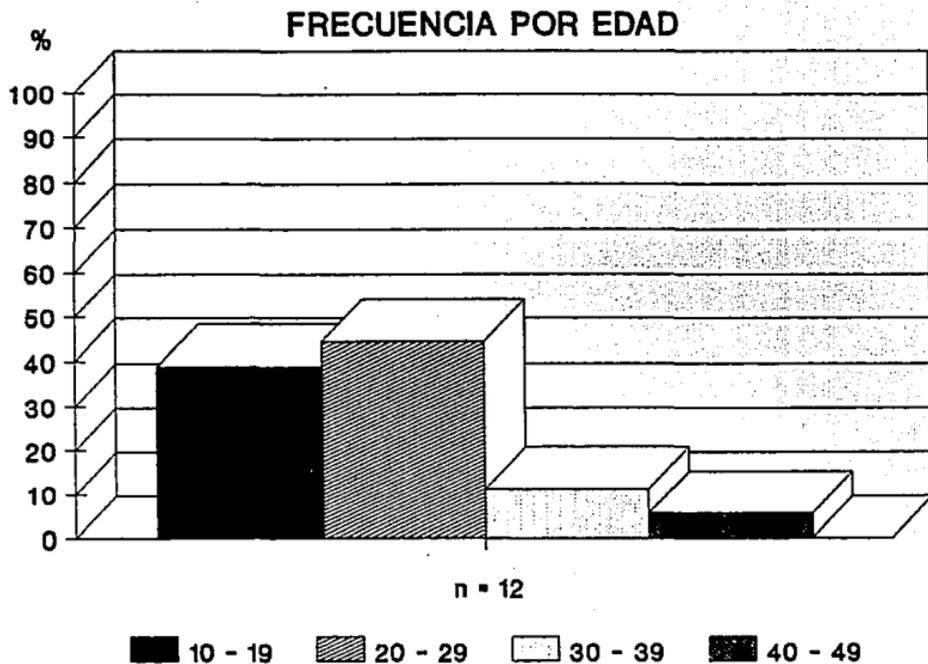


Fig.15 Frecuencia de aparición de enf. de Cushing en mujeres

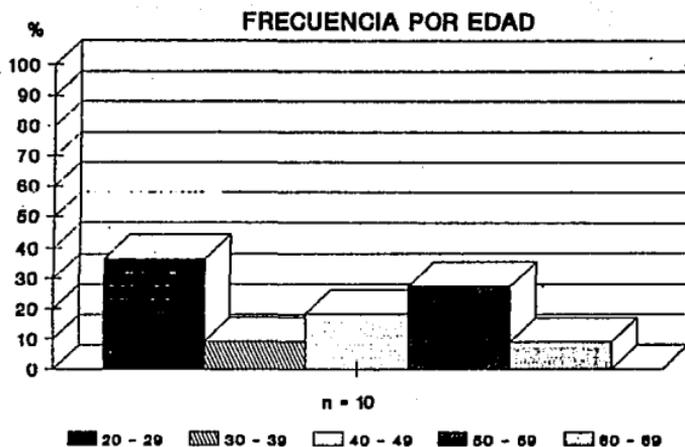


Fig.16 Frecuencia de aparición de adenoma no funcionante en mujeres

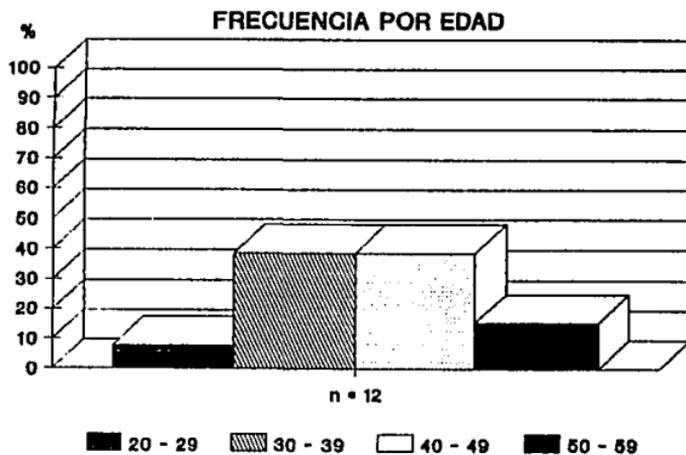


Fig. 17 Frecuencia de aparición de adenoma no funcionante en hombres.

7.2.5. Adenomas Mixtos

En mujeres estos adenomas se presentaron con una frecuencia similar en la tercera, cuarta y quinta década figura 18. En hombres la aparición de los casos estudiados fue en la tercera a la quinta década, sobre todo en esta última figura 19.

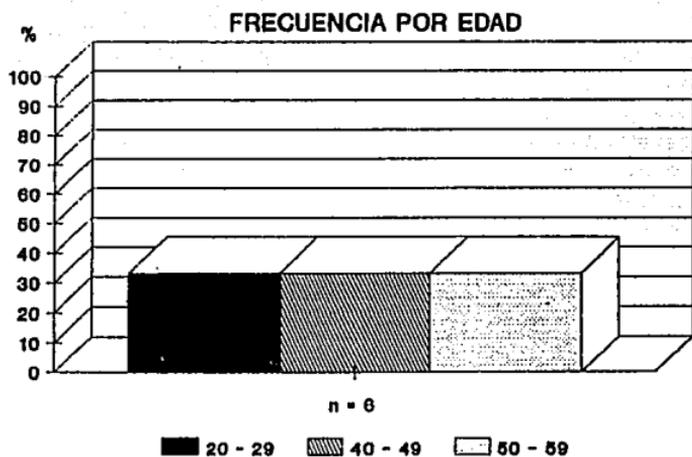


Fig.18 Frecuencia de aparición de adenoma mixto en mujeres.

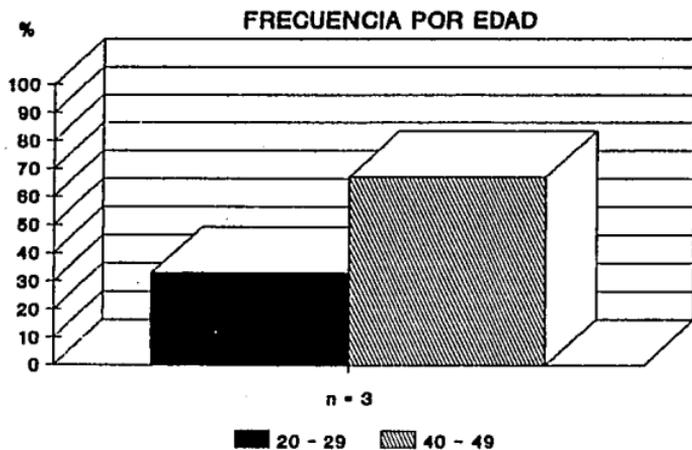


Fig.19 Frecuencia de aparición de adenoma mixto en hombres.

7.3. PERFIL HORMONAL NORMAL

En la figura 20 se presenta los niveles normales de FSH, LH, PRL, GH, cortisol, estradiol, ACTH y gastrina obtenidos en una población de mujeres normales (n = 8): Mientras que en la figura 21 se presentan los niveles normales de FSH, LH, PRL, GH, cortisol, ACTH, testosterona y gastrina en una población normal en hombres (n = 12).

Estos valores tomados como referencia aparecen en las tablas 9, 10, 11, 12 y 13.

PERFIL HORMONAL NORMAL

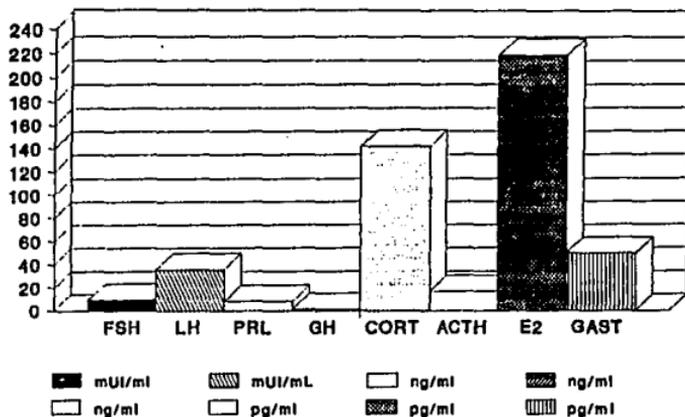


Fig.20 Perfil hormonal normal en mujeres. n = 8

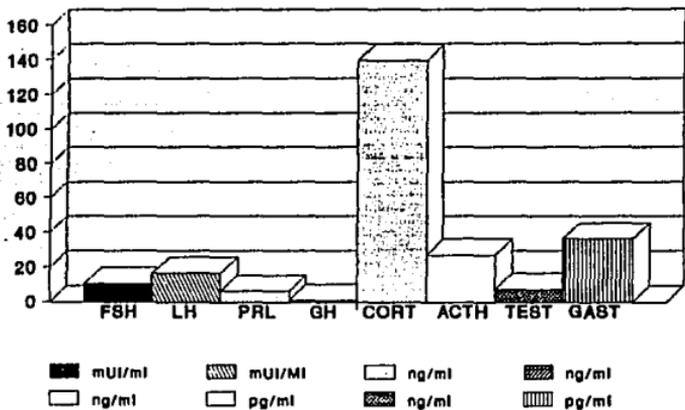


Fig.21 Perfil hormonal normal en hombres. n=12

7.4. PERFIL HORMONAL DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS

7.4.1. Prolactinoma

En la figura 22 se muestra el perfil hormonal del prolactinoma en mujeres y en la figura 23 el correspondiente a hombres. Se puede observar que la media de los valores de LH esta disminuída y se encuentra por debajo de los valores de referencia tabla 9. Las hormonas esteroideas (estradiol en la mujer y testosterona en el hombre) también se encuentran en concentraciones muy bajas. La GH, cortisol y gastrina presentan concentraciones normales en mujeres, en cambio la concentración media de la prolactina se encuentra muy elevada en relación a la banda de normalidad $< 20\text{ng/ml}$, siendo la diferencia estadísticamente significativa, ($p < .001$) así como también para los esteroides gonadales que es ($P < .001$); en hombres se encuentran valores mayores de 100 ng/ml de PRL con una $p < .001$.

Si por otra parte se analiza la concentración de prolactina en los diferentes tipos de adenomas (figuras 24 y 25). En mujeres como en hombres existe marcada hipersecreción de PRL generalmente $> 100\text{ ng/ml}$, siendo más elevados los valores en hombres. A diferencia del prolactinoma en la acromegalia los valores de PRL se encuentran en el rango normal, en los adenomas no funcionantes se observa ligera hiperprolactinemia ($> 20\text{ ng/ml}$), en los adenomas mixtos, también se observa hiperprolactinemia ($> 40\text{ ng/ml}$). Observándose en estas figuras los valores obtenidos en individuos normales: en mujeres $< 20\text{ng/ml}$, en el hombre $< 10\text{ng/ml}$.

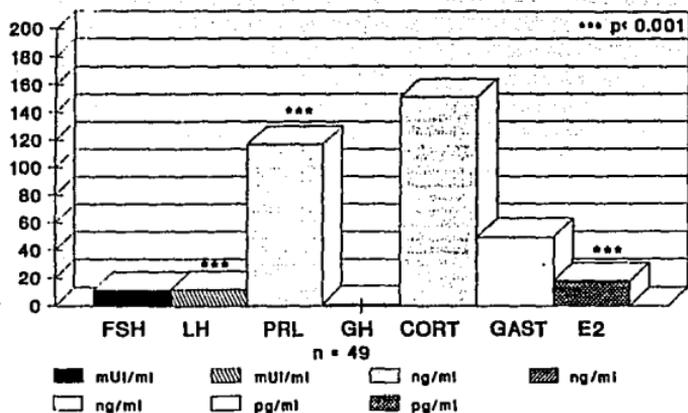


Fig. 22 Perfil hormonal del prolactinoma en mujeres.

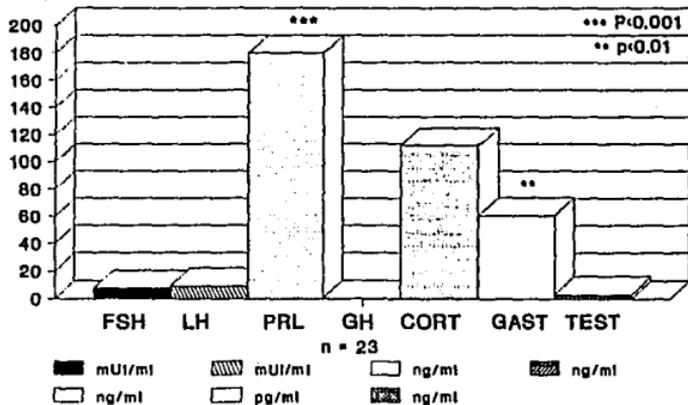


Fig. 23 Perfil hormonal del prolactinoma en hombres.

Tabla.9 NIVELES HORMONALES EN EL PROLACTINOMA.

P R O L A C T I N O M A								
	FSH	LH	PRL	GH	CORT	E2	TEST	GAST
\bar{x}	11.2	11.4	116.5	1.1	151.0	17.3		49.8
D.E.	6.8	7.3	82.5	1.1	84.2	15.0		18.0
N O R M A L E S								
\bar{x}	9.3	35.4	8.0	1.1	141.3	218.4		49.2
D.E.	3.9	12.2	5.4	0.9	45.5	65.8		8.7
R	5.4-13.2	23.2-47.4	2.6-13.4	0.2-2.0	55.8-186.8	152-284		40.5-57.9
p		< 0.001	< 0.001			< 0.001		
	P R O L A C T I N O M A							
\bar{x}	7.5	19.0	180.1	0.7	111.8		2.9	60.4
D.E.	4.1	4.3	126.8	0.5	92.9		1.5	17.0
N O R M A L E S								
\bar{x}	10.4	16.6	6.2	1.1	139.6		7.2	36.3
D.E.	3.0	4.2	2.8	0.9	35.9		1.9	4.9
R	7.4-13.4	12.4-20.8	3.4-8.8	0.1-2.0	103-175		5.3-9.1	31.4-41.2
p			< 0.001					< 0.01

\bar{x} = media D.E. = desviación estandar p = significancia estadística

R = rango de valores normales.

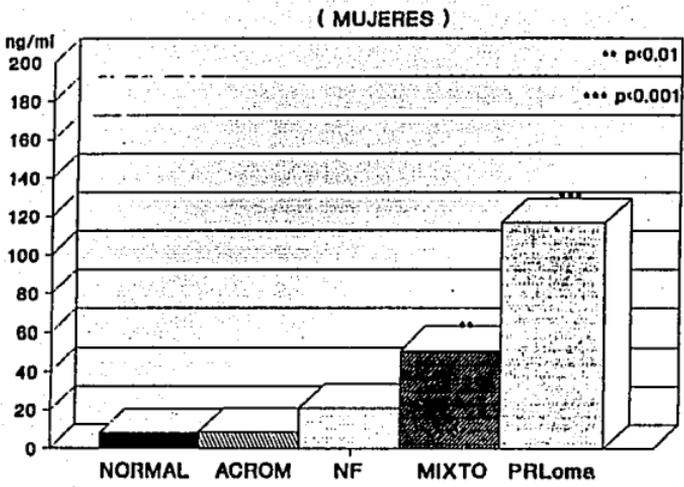


Fig.24 Concentración de prolactina en los diferentes tipos de adenomas.

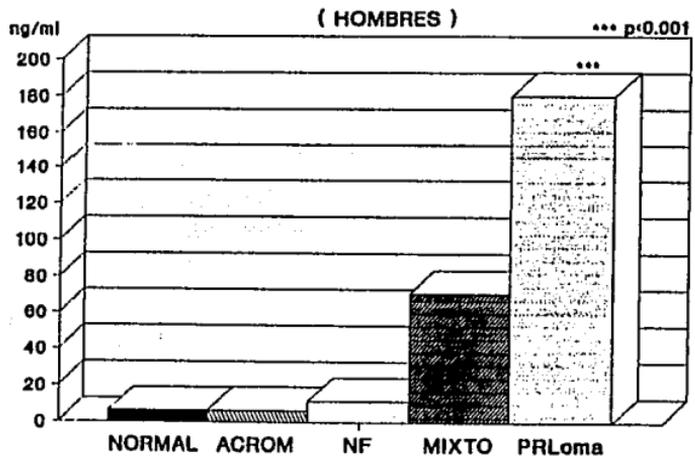


Fig. 25 Concentración de prolactina en los diferentes tipos de adenomas.

7.4.2. Acromegalia

En las figuras 26 y 27 se presenta el perfil hormonal obtenido para la Acromegalia en mujeres y hombres respectivamente. La media de los valores de FSH y LH se encuentra ligeramente baja en ambos sexos sobre todo LH, que en mujeres se encontró más disminuída. El estradiol en la mujer y la testosterona en el hombre también se encontraron disminuídos. En cambio el cortisol y la prolactina presentan valores normales de acuerdo a la tabla 10, mientras que la GH se eleva en forma característica por arriba de los valores de referencia (>7 ng/ml).

Si se comparan los niveles de GH en los diferentes tipos de adenomas, tanto en mujeres figura 28 como en hombres figura 29 puede verse que la secreción de GH está aumentada en forma importante en la acromegalia y en el adenoma mixto productor de GH y PRL.

Mientras que en los adenomas no funcionantes y en el prolactinoma se observan valores normales tanto en hombres como en mujeres, siendo mayor la secreción de GH en los hombres.

7.4.3. Enfermedad de Cushing

La concentración hormonal de ACTH y cortisol observado en las mujeres del grupo de estudio en la enfermedad de Cushing se presenta en la figura 30. Mientras que la figura 31 representa las concentraciones que tuvo el único hombre con este tipo de adenoma. En ambas gráficas los valores de cortisol y ACTH están elevados y por arriba de los niveles normales (tabla

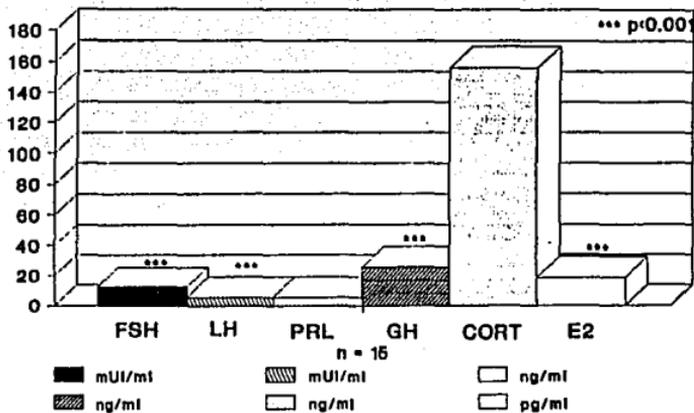


Fig. 26 Perfil hormonal de acromegalia en mujeres.

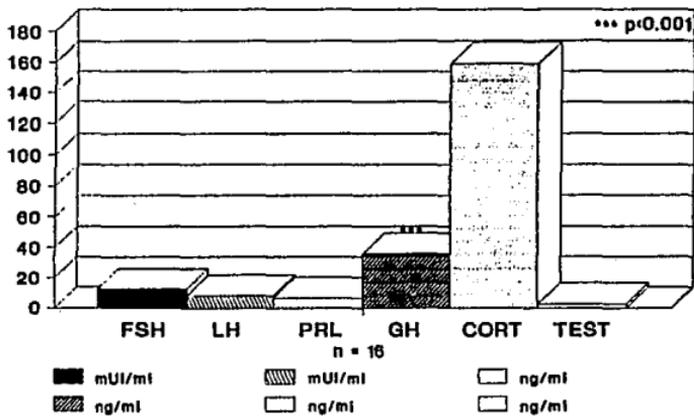


Fig. 27 Perfil hormonal de acromegalia en hombres.

Tabla.10 NIVELES HORMONALES EN ACROMEGALIA.

ACROMEGALIA							
	FSH	LH	PRL	GH	CORT	E2	TEST
\bar{x}	12.1	5.4	5.3	25.2	156.3	18.5	
D.E.	11.1	4.9	4.3	4.7	11.3	11.3	
VS	N O R M A L E S						
\bar{x}	9.3	35.4	8.0	1.1	141.3	218.4	
D.E.	3.9	12.2	5.4	0.9	45.5	85.8	
R	5.4-13.2	23.2-47.4	2.6-13.4	0.2-2.0	95-284	152-284	
P	< 0.001	< 0.001		< 0.001		< 0.001	
	ACROMEGALIA						
\bar{x}	12.3	8.7	6.4	35.6	158.8		3.1
D.E.	11.3	4.7	4.3	10.9	37.9		2.3
VS	N O R M A L E S						
\bar{x}	10.4	16.6	6.2	1.1	139.6		7.2
D.E.	3.0	4.2	2.8	0.9	35.9		1.9
R	7.4-13.4	12.4-20.8	3.4-8.8	0.1-2.0	103-175		5.3-9.1
P				< 0.001			

x = media

D.E. = desviación estandar

p = significancia estadística

R = intervalo de valores normales

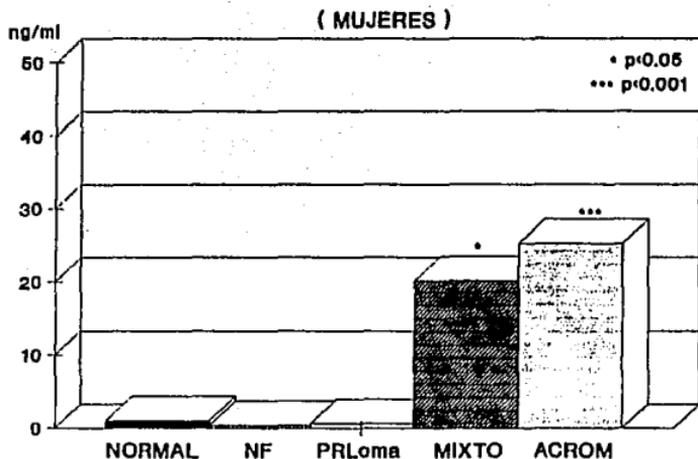


Fig. 28 Concentración de hormona de crecimiento en los diferentes tipos de adenomas.

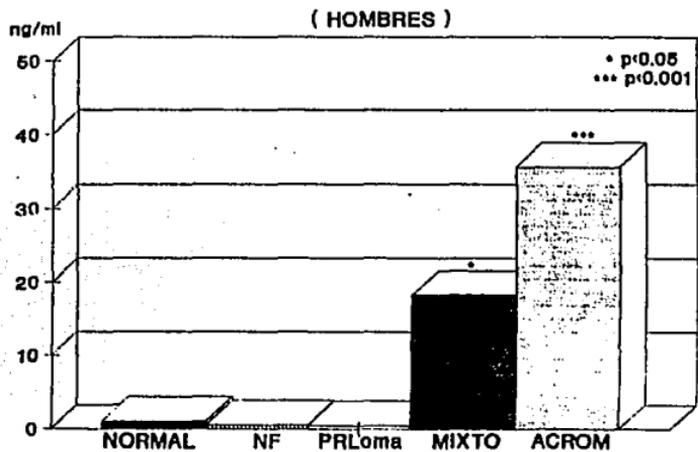


Fig.29 Concentración de hormona de crecimiento en los diferentes tipos de adenomas.

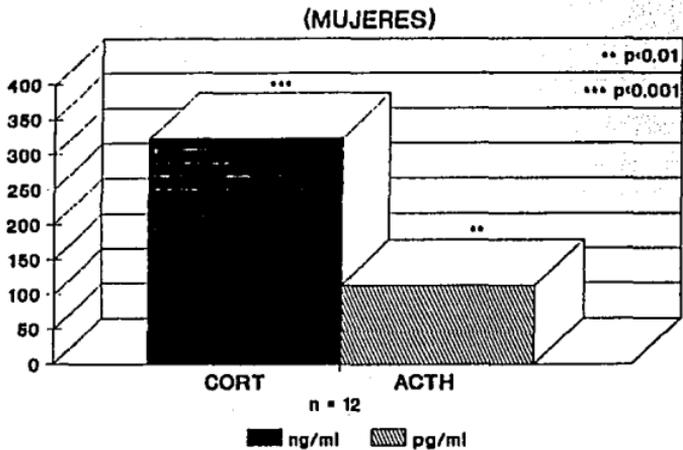


Fig. 30 Concentraciones de cortisol y ACTH en la enf. de Cushing.

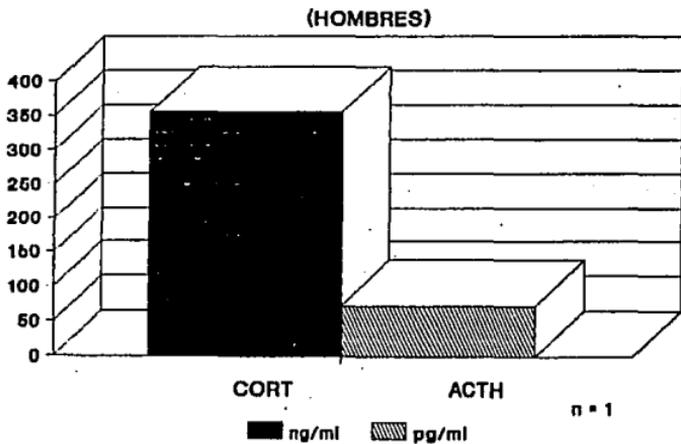


Fig. 31 Concentración de cortisol y ACTH en la enf. de Cushing.

11), siendo las diferencias para el cortisol altamente significativa ($P < .001$); en cambio en los otros tipos de adenomas (figuras 32 y 33) los niveles de cortisol fueron normales en límites altos.

7.4.4. Adenoma No Funcionante

Las figuras 34 y 35 representan el perfil hormonal del adenoma no funcionante en mujeres y hombres respectivamente. Como puede observarse, los pacientes con este tipo de adenoma tienen valores normales de FSH y LH, pero se encuentran disminuidos los valores de estradiol en las mujeres y los de testosterona en el hombre. El cortisol y la GH se encuentran dentro de la banda normal, destacando la elevación de la gastrina sobre todo en las mujeres con una media de concentración por arriba de los valores normales tabla 12. Los valores de prolactina se encuentran en el límite superior normal, debido a que algunos casos presentaron hiperprolactinemia.

7.4.5. Adenoma Mixto

El perfil hormonal de los adenomas mixtos tanto en mujeres como en hombres figuras 36 y 37 muestran que en las mujeres los valores de LH se encuentran por abajo de la media normal, mientras que la de FSH esta elevada destacando la elevación de GH y PRL por arriba de la media de los valores de referencia (tabla 13).

Tabla.11 NIVELES HORMONALES EN LA ENFERMEDAD DE CUSHING.

ENFERMEDAD DE CUSHING		
	CORTISOL	ACTH
- x	322.0	112.0
D.E.	76.6	85.0
V8	NORMALES	
- x	141.3	16.4
D.E.	45.6	7.1
R	95-188	9.3-23.5
P	< 0.001	< 0.01
	n = 1	
	355.0	72.6
	NORMALES	
- x	139.8	26.8
D.E.	35.9	10.8
R	104-175	16-37.6

x = media

D.E. = Desviación estandar

P = significancia estadística

R = Intervalo de valores normales.

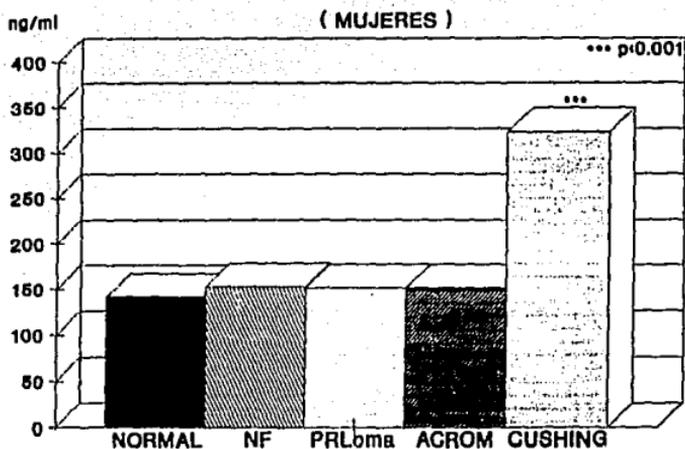


Fig.32 Concentraciones de cortisol en los diferentes tipos de adenomas.

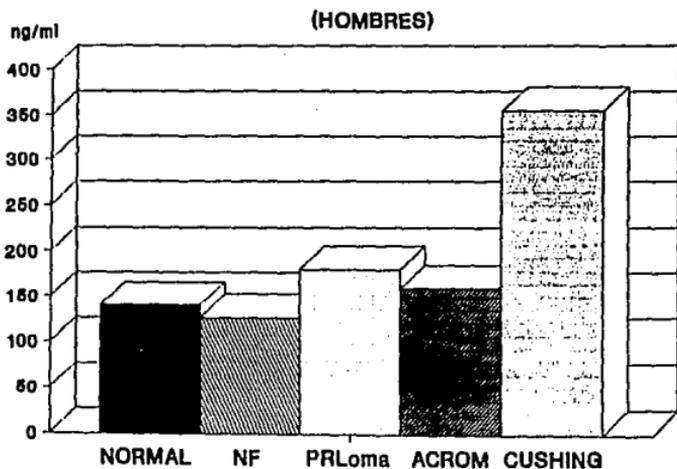


Fig.33 Concentraciones de cortisol en los diferentes tipos de adenomas.

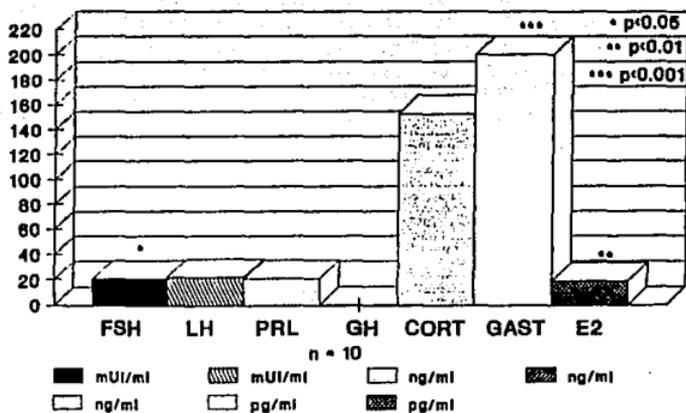


Fig. 34 Perfil hormonal del adenoma no funcionante en mujeres

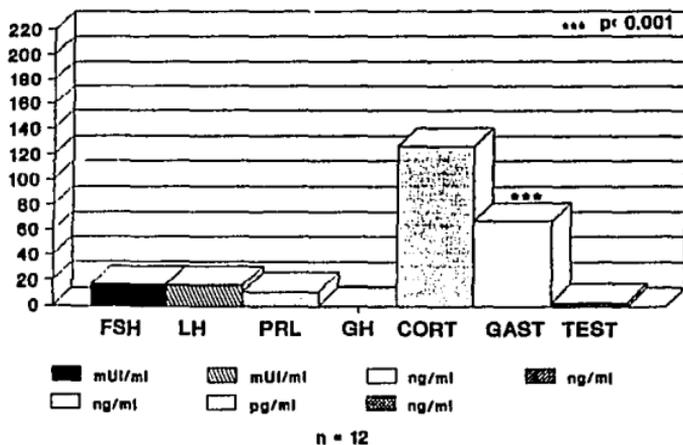


Fig.35 Perfil hormonal del adenoma no funcionante en hombres

Tabla.12 NIVELES HORMONALES EN EL ADENOMA NO FUNCIONANTE.

ADENOMA NO FUNCIONANTE								
	FSH	LH	PRL	GH	CORT	E2	TEST	GAST
X	20.4	21.9	21.1	0.41	152.6	18.8		203.0
D.E.	11.2	12.3	10.3	0.27	70.3	12.0		37.6
VS	N O R M A L E S							
X	9.3	35.4	8.0	1.1	141.3	218.4		49.2
D.E.	3.9	12.2	5.4	0.9	45.5	65.8		8.7
R	5.4-13.2	23.2-47.4	2.6-13.4	0.2-2.0	95-186	156-284		40.5-57.9
P	< 0.05					< 0.01		< 0.001
ADENOMA NO FUNCIONANTE								
	FSH	LH	PRL	GH	CORT	E2	TEST	GAST
X	16.5	16.3	11.5	0.53	128.4		3.1	68.8
D.E.	13.0	12.0	7.4	0.24	82.8		2.3	28.3
VS	N O R M A L E S							
X	10.4	16.6	6.2	1.1	139.6		7.2	36.3
D.E.	3.0	4.2	2.8	0.9	35.9		1.9	4.9
R	7.4-13.4	12.4-20.8	3.4-8.8	0.1-2.0	103-175		5.3-9.1	31.4-41.2
P								< 0.001

x = media

D.E. = desviación estandar

p = significancia estadística

R = Intervalo de valores normales

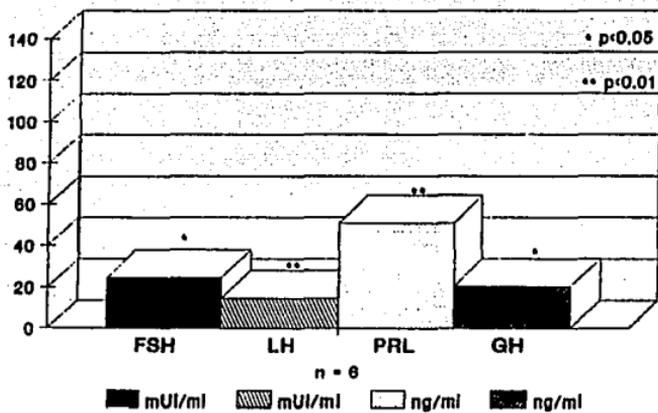


Fig. 36 Perfil hormonal del adenoma mixto en mujeres.

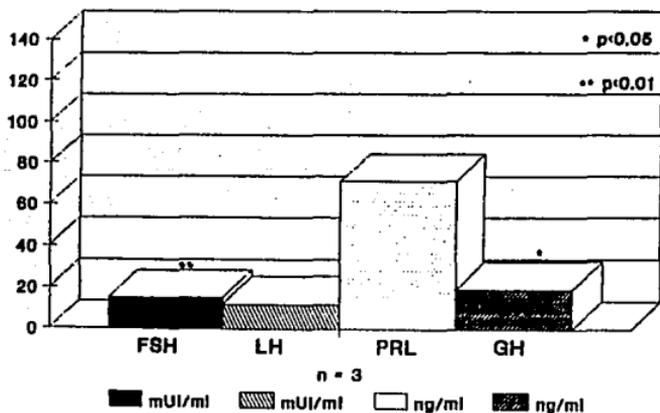


Fig. 37 Perfil hormonal del adenoma mixto en hombres.

Tabla.13 NIVELES HORMONALES EN EL ADENOMA MIXTO.

ADENOMA MIXTO					
		FSH	LH	PRL	GH
\bar{x}		24.4	14.4	50.8	20.2
D.E.		20.7	5.8	10.2	20.0
VS		NORMALES			
\bar{x}		9.3	35.4	8.0	1.1
D.E.		3.9	12.2	5.4	0.9
R		5.4-19.2	23.2-47.8	2.6-13.4	0.2-2.0
P		< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.05
M		15.0	12.0	71.0	19.0
D.E.		10.8	7.0	5.0	8.4
VS		NORMALES			
\bar{x}		10.4	16.6	6.2	1.1
D.E.		3.0	4.2	2.8	0.9
R		7.4-13.4	12.4-20.8	3.4-9.0	0.0-2.0
P		< 0.01		< 0.1	< 0.05

X = media

D.E. = Desviación estandar

P = significancia estadística

R = intervalo de valores normales.

7.5. PRUEBAS DINAMICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS

7.5.1. Enfermedad de Cushing

a) Ritmo circadiano de Cortisol

La figura 38 muestra que en individuos normales los valores de cortisol se incrementan después de las 24 horas alcanzando un máximo de concentración entre las 4 y las 8 horas, después comienzan a disminuir a lo largo del día, llegando a su valor más bajo entre las 16:00 y 20:00 horas; en cambio en la enfermedad de Cushing (figura 39) los niveles de cortisol no presentan el ritmo de secreción característico y están elevados en relación a las cifras normales o se encuentran en los límites superiores en las diferentes horas del día.

b) Supresión con Dexametasona

En la figura 40 se observa que cuando se administra dexametasona a una persona normal (2 y 8 mg) se suprime la concentración de cortisol en forma importante, en cambio en los pacientes con la enfermedad de Cushing (figura 41) no se suprimen los niveles de cortisol o sólo se logra una ligera supresión, aún después de administrar 8 mg del esteroide.

7.5.2. Acromegalia

Prueba de tolerancia a la glucosa.

En los pacientes acromegálicos se observaron dos tipos de respuesta a la carga de glucosa:

a) Supresión parcial de GH (figura 42)

b) No supresión de GH (figura 43)

En el primer tipo de respuesta se observa que los valores de

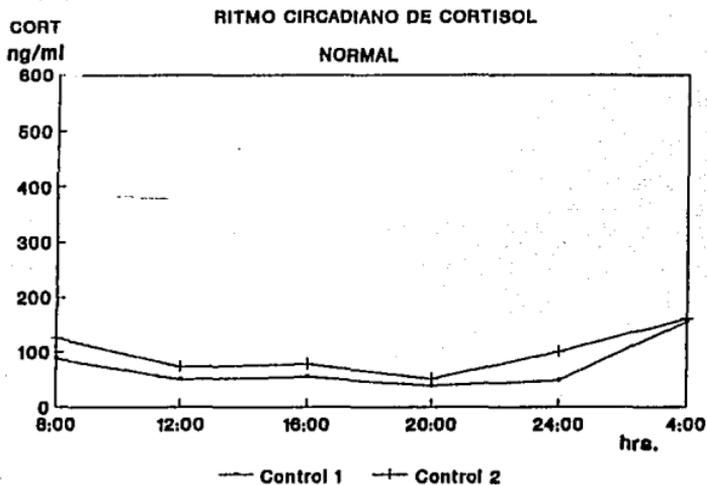


Fig.38 Ritmo circadiano de cortisol en individuos sanos.

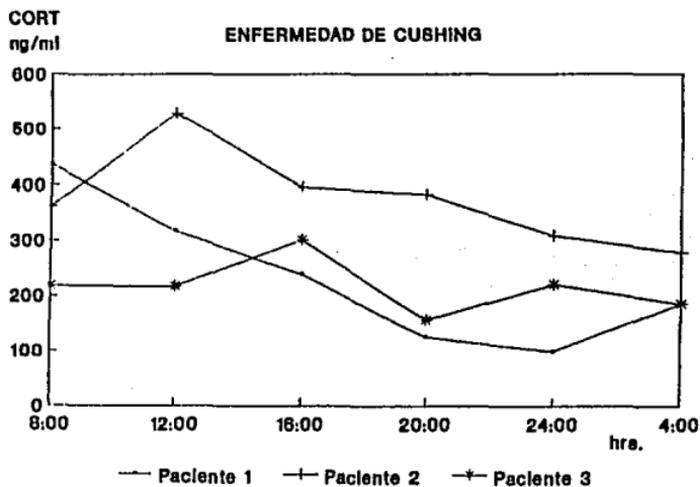


Fig.39 Ritmo circadiano en pacientes con enf. de Cushing.

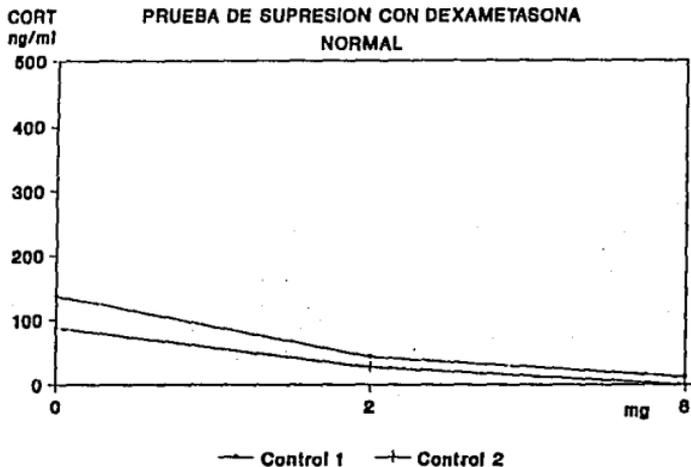


Fig.40 Prueba de supresión con dexametasona en individuos sanos.

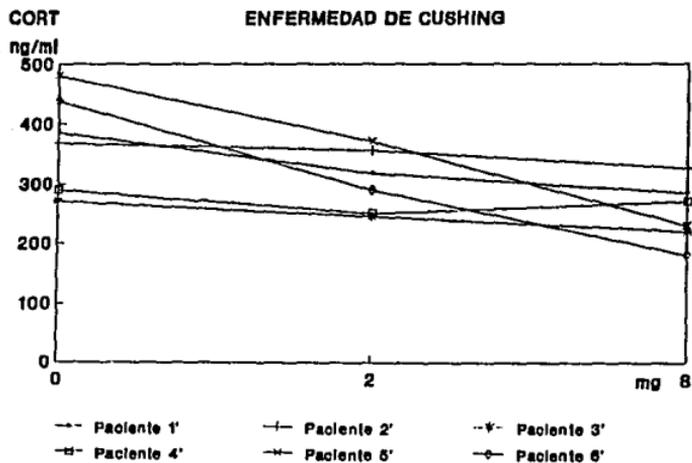


Fig.41 Prueba de supresión con dexametasona en pacientes con enf.de Cushing

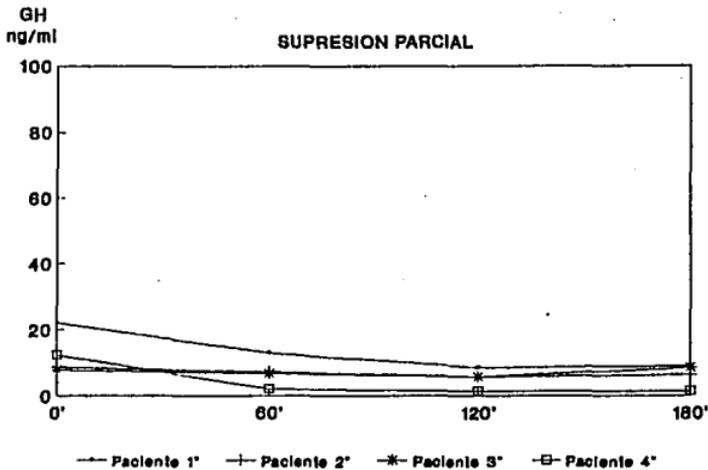


Fig.42 Prueba de tolerancia a la glucosa en pacientes acromegálicos.

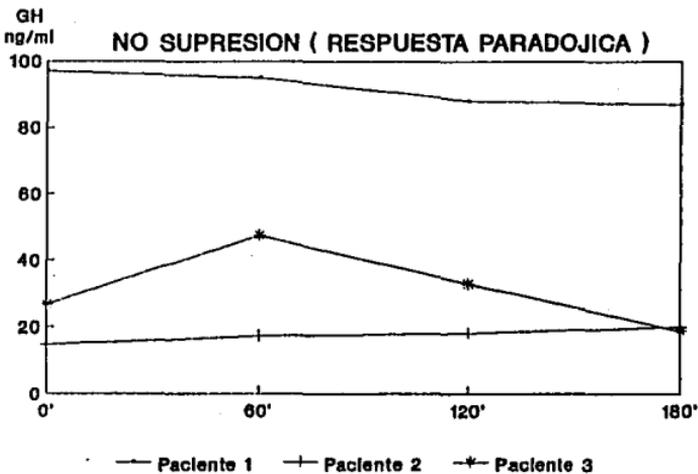


Fig.43 Prueba de tolerancia a la glucosa en pacientes acromegálicos.

la GH, en la muestra basal se encuentran elevados y posterior a la carga de glucosa disminuyen obteniéndose un 20 - 50% de supresión de la concentración de GH.

En cambio en la figura 43 puede verse que en otros pacientes acromegálicos en los que la concentración basal de GH se encuentra muy por arriba de lo normal, la concentración de la hormona no se suprime post carga de glucosa, manteniéndose en niveles elevados. Se observa también que en algunos pacientes no sólo no se suprime la concentración de GH sino que por el contrario aumenta (respuesta paradójica).

7.6 RESPUESTA DE LA GH Y LA PRL A LA BROMOCRIPTINA

En el prolactinoma y en la acromegalia (figuras 44 y 45) se presenta la respuesta de la PRL (prolactinoma) y de la GH (acromegalia) respectivamente, a una dosis de 5 mg de bromocriptina por vía oral. Como se observa en el caso del prolactinoma (se representan dos casos) hay una disminución progresiva de la secreción de PRL que alcanza un mínimo 6 horas después de administrado el fármaco; en el caso de la acromegalia se observa como algunos pacientes tienen una buena respuesta, disminuyendo notablemente la concentración de GH (* y -), sin embargo otros no responden, manteniéndose elevada la GH (+).

ACCION FARMACOLOGICA DE LA BROMOCRIPTINA

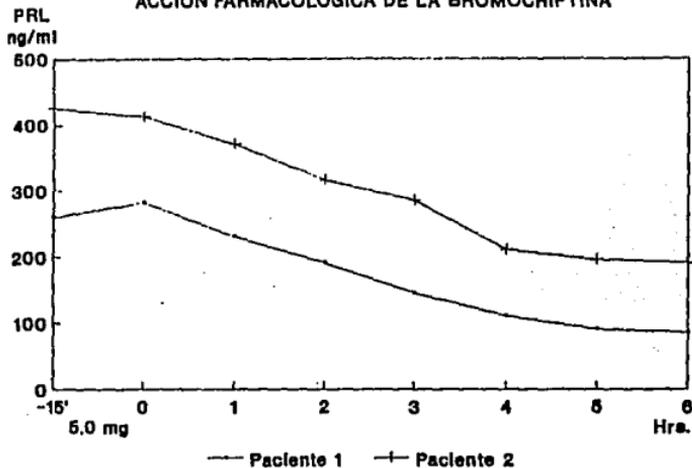


Fig. 44 En pacientes con prolactinoma.

ACCION FARMACOLOGICA DE LA BROMOCRIPTINA

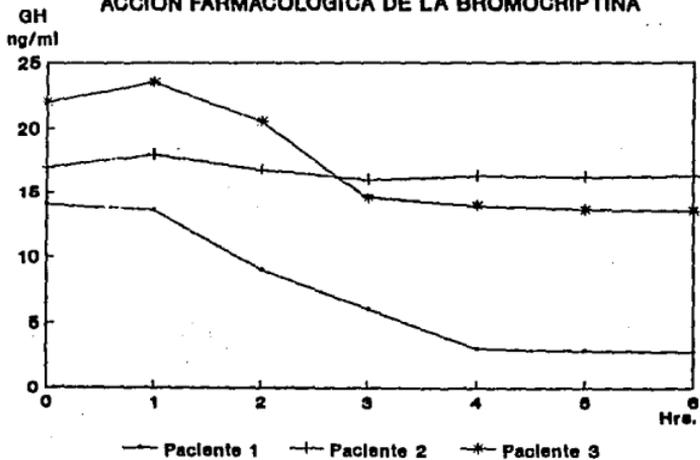


Fig. 45 En pacientes con acromegalia.

8.0 DISCUSION

Los resultados del presente estudio demuestran que el radioinmunoanálisis (RIA) es, por su elevada sensibilidad, especificidad y precisión, una poderosa herramienta, de gran utilidad para el estudio de los adenomas hipofisarios. Permite realizar no solamente el diagnóstico del adenoma cuando los niveles hormonales son elevados, sino también determinar la estirpe del tumor mediante la cuantificación de la hormona o de las hormonas que son producidas en forma selectiva por los diferentes tipos de adenomas dependiendo del tipo celular afectado por la deformación adenomatosa. Como se demostró, el RIA ha permitido también el establecimiento de pruebas dinámicas que tienen por objeto realizar un diagnóstico más preciso, sobre todo cuando los valores hormonales son limitrofes, es decir, se encuentran en los límites altos de los valores normales y en los cuales el realizar una prueba dinámica adecuada puede corroborar un diagnóstico presuntivo o puede descartarlos como son: la carga de glucosa en acromegalia, los ritmos circadianos de ACTH y cortisol en la enfermedad de Cushing o la prueba de dexametasona. Además de permitir conocer el perfil hormonal de cada tipo de adenoma y con ello obtener información pertinente acerca de otras hormonas que pueden encontrarse modificada además de la hormona hipersecretada en forma típica, en ocasiones en forma importante requiriendo tratamiento médico sustitutivo (en caso de alguna deficiencia). Así mismo, se manifiesta un mayor predominio de aparición de este tipo de adenomas en mujeres que en hombres. Así por ejemplo los valores hormonales obtenidos en los casos de

prolactinoma corroboraron que la PRL es hipersecretada específicamente, por este tipo de adenoma pero también demostró que la hiperprolactinemia inhibe la secreción de gonadotropinas hipofisiarias (FSH, LH) que se encontraron disminuídas probablemente como consecuencia de cambios en la secreción de Gn - RH (hormona liberadora de gonadotropinas). En consecuencia el efecto positivo que ejercen FSH y LH sobre la síntesis de los esteroides gonadales también disminuye, por lo que las mujeres con prolactinoma tienen una deficiencia de estrógenos y los hombres de testosterona tal como se observó en los pacientes estudiados en este grupo.

En cuanto a la distribución de estos adenomas de acuerdo a los resultados obtenidos se pudo demostrar que el prolactinoma es el tipo de adenoma que se presenta más frecuentemente (48%) en pacientes de ambos sexos y que por edades, en el grupo de mujeres estudiado la mayor incidencia se encuentra alrededor de los 30 a 39 años.

En el hombre el prolactinoma se presentó también en pacientes juveniles, aunque su mayor frecuencia se encontró en la quinta década.

En la acromegalia, a diferencia del prolactinoma la edad más frecuente de presentación del padecimiento en el grupo de mujeres estudiado fue entre los 20 a 29 años de edad, lo cual coincide con la literatura que refiere su aparición entre la tercera y quinta década. En cambio en el hombre la acromegalia la mayor frecuencia se encontró entre los 40 y 50 años de edad.

Debe mencionarse que la aparición de este adenoma en la segunda década corresponde por la edad de los pacientes a casos de

gigantismo y no de acromegalia. Desde el punto de vista hormonal estos adenomas se caracterizaron por su elevada producción de GH, así como en el crecimiento excesivo de las partes blandas del cuerpo y otras manifestaciones clínicas. En estos adenomas los valores de LH se encontraron disminuidos en ambos sexos y aunque no se conoce la causa con exactitud se piensa que la secreción elevada de la hormona de crecimiento, es capaz de alterar la secreción de LH y en consecuencia la producción de testosterona que se encontró disminuída en los hombres portadores de este tipo de adenoma.

Por otra parte se sabe que el exceso de GH en la mujer produce anovulación crónica y severas anormalidades del ciclo menstrual con estrógenos bajos. Desde el punto de vista diagnóstico la determinación de GH por RIA postcarga de glucosa es de gran utilidad, ya que cuando se observa el mantenimiento de valores elevados de GH por arriba de lo normal, una respuesta paradójica sin haber supresión de la hormona puede inferirse que el paciente tiene acromegalia, ya que la secreción de la hormona no responde a los mecanismos normales de regulación hormonal, en cambio en una persona normal la hiperglucemia provocada por la carga de glucosa suprime la secreción de GH. En la acromegalia la secreción de GH por el tumor es autónoma y no obedece los mecanismos de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-célula blanco, por lo que al administrar la carga de glucosa no se suprime la secreción de GH.

En la enfermedad de Cushing, los pacientes con este tipo de adenomas secretan predominantemente ACTH en forma autónoma, por lo que además se encontraron valores elevados de cortisol por lo

general un hipercortisolismo importante a lo que se deben las manifestaciones clínicas características de éste síndrome. Como son la hiperglicemia y la predisposición hacia las infecciones consecuencia de la depresión del sistema inmune. Los valores de cortisol obtenidos del ritmo circadiano confirman la autonomía de la secreción en los pacientes con enfermedad de Cushing, ya que la secreción continua de ACTH por el tumor produce hipercortisolismo persistente, perdiéndose el ritmo circadiano que presentan las personas normales. Por otra parte la prueba de inhibición con dexametasona también tiene gran valor diagnóstico, ya que como se observó la administración de dexametasona normalmente produce supresión en la secreción de ACTH y cortisol de aproximadamente un 50 % en relación a la cifra basal, cuando esta supresión no ocurre se confirma el diagnóstico. Contraria a otro tipo de adenomas la mayor frecuencia de enfermedad de Cushing se presentó en mujeres jóvenes en la segunda década de la vida, lo cual esta de acuerdo a lo informado en la literatura. El único caso detectado en hombres se presentó en la segunda década de la vida correspondiendo a un caso de enfermedad de Cushing juvenil. En la literatura se informa que son más frecuentes estos adenomas en la mujer que en el hombre, en una proporción 3:1 y en el presente estudio la proporción fue mayor.

De acuerdo a los antecedentes previos los adenomas no funcionantes se caracterizan por presentar valores normales o bajos, para la mayoría de las hormonas no existe una hipersecreción hormonal característica de ahí su nombre. Sin

embargo en nuestro estudio mujeres con este tipo de adenoma tuvieron una ligera elevación de la concentración de PRL, destacando la elevación de gastrina, la cual se encontró normal en los hombres del grupo. La mayoría de estos adenomas fueron macroadenomas diagnosticados no por su concentración hormonal sino debido a los síntomas neurológicos tales como cefalea y disminución de los campos visuales por compresión del quiasma óptico, como consecuencia del tamaño del tumor; además de radiografía placa simple de cráneo y tomografía axial computarizada de elevada resolución.

La ligera hiperprolactinemia y la elevación de la gastrina sugieren que este tipo de tumores son secretores de ambas hormonas, contrariamente al nombre que reciben estos adenomas.

La frecuencia de aparición del adenoma no funcionante en la mujer se encontró en la tercera década de la vida con una frecuencia variable en las diferentes edades. En el hombre estos adenomas se presentaron poco en hombres jóvenes con la mayor frecuencia entre los 30 y 50 años.

La importancia de las determinaciones hormonales para el estudio de los adenomas hipofisarios se puso de manifiesto también en los pacientes con adenomas mixtos de este estudio. Inicialmente fueron clasificados como adenomas secretores de la hormona de crecimiento por las manifestaciones clínicas de los pacientes, sin embargo, al realizar las determinaciones hormonales se encontró que también secretaban prolactina (PRL) en cantidades importantes, por lo cual se les reclasificó como adenomas mixtos, separándose del grupo de acromegalia; encontrando que algunas de

las pacientes presentaban también galactorrea debido a cifras elevadas de PRL. Con respecto a estos adenomas podemos decir que son los que se presentan menos frecuentemente (6%) de los diferentes tipos de adenomas apareciendo tanto en la mujer como en el hombre a partir de la tercera década de la vida.

9.0 CONCLUSIONES

Como conclusión final se podría mencionar que el RIA para cuantificar a las hormonas mostró gran utilidad para el estudio y caracterización de los adenomas hipofisarios, ya que permitió establecer:

1. La frecuencia con la que se presenta los diferentes tipos de adenomas: Prolactinoma 48%, acromegalia 22%, enfermedad de Cushing 9 %, no funcionante 15 % y mixto 6%. Su mayor prevalencia en mujeres 92 casos y en el hombre 57 casos, una frecuencia de aparición variable que puede ir desde la segunda a la séptima década. En una forma general la alteración de la retroalimentación negativa en la producción de las gonadotrofinas hipofisarias (FSH Y LH) y su efecto en las hormonas esteroideas (E2, Test) por la disminución de la concentración de estas hormonas a la presencia del tumor. Hallándose una significancia estadística en estas hormonas al compararlas con el grupo control y como hallazgo la hipersecreción de la gastrina y la PRL en los adenomas no funcionantes.
2. Establecer valores hormonales de referencia con los cuales se comparó la población en estudio. Los cuales entran dentro de los parámetros establecidos para otras poblaciones no mexicanas.

3. Al utilizar pruebas dinámicas para la confirmación de los diagnósticos de:

Acromegalia (curva de tolerancia a la glucosa), se manifestaron dos tipos de respuesta: una la supresión parcial de la GH y la respuesta conocida como paradójica (no supresión).

En la enfermedad de Cushing la evaluación de una serie de determinaciones de cortisol conocida como ritmo circadiano manifestaron el hipercortisolismo presente a lo largo de 24hs. corroborando la pérdida del mismo al compararlo con una secreción normal de cortisol en individuos sanos, manifestando la autonomía de secreción de la ACTH. En la prueba de supresión con dexametasona se manifestó que aún a la presencia de este corticoesteroide, los pacientes con esta enfermedad tuvieron una supresión mínima del cortisol y en cambio los pacientes normales manifestaron una total supresión en la secreción de cortisol. Los resultados obtenidos corroboran la utilidad de estas pruebas.

4. Los resultados obtenidos de una serie de determinaciones de PRL en el prolactinoma y de GH en la acromegalia después de la administración de una dosis de 5mg de bromocriptina demostraron el efecto inhibitor de este farmaco en la secreción de ambas hormonas al disminuir su concentración.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Arafah B.M. Reversible hypopituitarism in patients with large non functioning pituitary adenomas. *J.Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 1173.
2. Aron D.C., Findling J.W. and Blake Tyrrell J. Cushing's Disease. *Endocrinology and metabolism Clinics* 1987;16(3):705-729.
3. Asa S., Kovacs K. Histological Classification of pituitary disease. *J. Clin Endocrinol Metabol* 1973;12:567-572.
4. Balton A.E., Hunter W. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a 125I containing acylating agent. *J. Biochem* 1973;133:529-539.
5. Barkan A.L. Acromegaly diagnosis and therapy. *Endocrinol Metab Clinic North Am* 1989;18(2):277-310.
6. Baumann G. Acromegaly. *Endocrinology and Metabolism Clinics North Am* 1987; 16(3):685.
7. Baxter J.D., Macleod K.M. Molecular Basis for hormone action in metabolic control and disease, 8th ed., edited by Bondy P.K., Rosenberg L.e., Philadelphia 1980; 103-160.
8. Bergh T., Nillius S.J. "Hiperprolactinemia in amenorrhoea incidence and clinical significance". *Acta Endocrinol* 1977;86:683.
9. Berson S.A., Yalow R.S. General principles of radioimmunoassay. *Clin Chem Acta* 1968;22:51.
10. Berson S.A., Yalow R.S. In the hormones. Edit. Princess New York Academic Press 1964;4:557-564.
11. Besser G.M. Medical management of prolactinomas in : givens ed, hormone - secreting pituitary tumors; Chicago year book medical publishers 1982; 255-273.
12. Burch W.M. Cushing's disease review, *Arch Inter Med.* 1985; 145:106-111.

13. Burke C.W., Doyle F.H., Joplin G.F. and col. Cushing's disease: treatment by pituitary implantation of radioactive gold and trytiumseeds. Q.J. Med 1991;42:693-714.
14. Carpenter P.C. Diagnostic evaluation of Cushing's Syndrome. Endocrinol and Metabolism Clinics of North Am 1989;18(2):259-276.
15. Facts and F. Number of receptor sites from Scatchard graphs Science 1982;217:1247-1249.
16. Dalkin A.C., Marshall J.C. Medical therapy of hyperprolactinemia. Endocrinol and Metabolism of North Am 1989;18(2):259-276.
17. Fasekas de St Groth S.J. and Scheidegger. Monoclonal antibodies. Immunol Methods 1980; 35:1.
18. Fowler M.R., Mckeel D.W. Jr. Human adehyphyseal cuantitative histochemical cell. Arch Pathol Lab Med 1979;103:613-620.
19. Freedman R. and Carter D.B. Neuroendocrinal strategies in psychiatrics research in A. Vernadalis an P.S. timiras (eds) Hormones in development and aging ,New york Spectrum 1982;619-636.
20. Goebelsmann U. Protein and steroid hormones in pregnancy. The Journal of reproductive medicine 1979;23:167-177.
21. Grafton D.CH., Rabinowits J.L; Principles of radioisotope methodology. Burger Publishing Company 3a. edition Minn. 1983;284-287.
22. Greeespan S.F., Forsham H.O. Endocrinologia básica y clínica 2a. edición México: edit Manual Moderno 1988; 345-378.
23. Greenwood F.C., Hunter W.M. Golver J.S. The preparation of ¹³¹I labelling human growth of high specific radioactivity. Journal Bichem 1963;89:114-123.
24. Hadley M.E. Endocrinology, second edition. Englewood Clifs N.J. Prentice Hall 1988;115-118.

25. Hill S.A., Falko J.M. Wilson C.V., Hunt W.E. Thyrotropin producing pituitary adenomas. J. Neurosurg. 1982;57:515.
26. Hikfelt T., Evertt B. Neurons with multiple messenger with special reference to neuroendocrine systems. Recent Progress in hormone research. 1986;42:1-70.
27. Jadresic A., Banks L.M., Child D.F. The acromegaly syndrome relation between clinical features, growth hormone values and radiological characteristics of the pituitary tumours. Q.J. Med. 1982;51:189-204.
28. Jaffe B. M., Behrman B. Methods of hormone radioimmunoassay Academic Press N.Y. 1979; 207-210.
29. Jameson J.L., Kay T.W.H. Glycoprotein hormone-producing pituitary tumours. Advances in Endocrinology and Metabolism. 1981;2:125-141.
30. Klibanski A., Ridway E.C. Pure alpha subunit secreting pituitary tumours. J.Neurosurg. 1983;159:583-587.
31. Kjellberg R.N. Craniopharyngiomas in : Tindall G.T. Collins W.F.eds. Clinical management of pituitary disorders. New York Ramen Press 1979;373-388.
32. Kleinberg D.L., Noel G.L., Frantz A.G. Galactorrhea a study of 235 cases. N. Eng.J.Med.1977;296:589-600.
33. Klibanski A. Non secreting pituitary tumours. Endocrinology and Metabolism Clinics 1987;16(3):793-803.
34. Klimm B. and Kjellberg R. Endocrine causes of menstrual disorders. James R. Givens editor. Year Book Medical Publishers Inc. 1978;165-180.
35. Kovacs K., Horvarth E., Ryan N. Immunocytoology of the human pituitary in : De Lellis Ra. ed. Diagnostic immunohistochemistry. New York: Masson publishing USA Inc. 1981;17-35.
36. Loyo M., Del Valle R., Morán C., Zárate A. Microcirugía transesfenoidal para el tratamiento del adenoma hipofisario. Rev. Med. IMSS. Mex. 1986;24:189-193.

37. Loyo M., Morán C., Espinoza R., Kleriga E. Zárate A. Tratamiento de la acromegalia por microcirugía transesfenoidal. Rev. Med. IMSS. Mex. 1986;24:337-341.
38. Midgley A.R., Niswender G.D., Regar R.W. Principles for the assessment of reliability of radioimmunoassay methods. Acta Endocrinol. 1969;63:142-163.
39. Murray P.D. Methods in enzymology guide to protein purification. Academic Press 1990;53:700-718.
40. Naidich T.P., Pinto R.S. Evaluation of sellar and parasellar masses by computer tomography. Radiology 1976;122:91-94.
41. Netter F.H. Sistema endocrino y enfermedades endocrinas Tomo IV. Salvat edits. 1980;4-11.
42. Odell W., Skowsky R., Abraham G. Production of antisera for polypeptide and steroid radioimmunoassay. Biology of reproduction 1972;6:427-442.
43. Piva F., Motta M. and Martini. Regulation of hypothalamic and pituitary function: long, short and ultrashort feed-back loops. In L.J. de Groot (eds) New York Grunne and Stratton. Endocrinology 1979;1:21-33.
44. Robertson G.L. The regulation of vasopressin function in health and disease. Recent Prog Horm Res. 1977;33:333.
45. Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. Clin Chem. 1974;20:1255.
46. Rodbard D., Rayford P.L., Cooper J.A., Ross G.T. Statistical quality control of radioimmunoassays. J. Clin. Endocr. 1968;28:1412.
47. Sammon P.L. Electrolytic iodination. J. Endocrinol. 1963;90:1598.
48. Shaffi U.M. and Wrightson P. Dural invasion by pituitary tumours. N.Z. Med. J. 1975;81:386.

49. Shy K.K., Metirman A.M., Dalling J.R. Oral contraceptive use and occurrence of pituitary prolactinoma. JAMA 1983;249:2204-2207.

50. Skelley D.S., Brown L.P., Besh P.K. Radioimmunoassay. Clin Chem. 1973;19(2):146-186.

51. Robert C. Smallridge. Thyrotropin - secreting pituitary tumours. Endocrinology and Metabolism Clinics. 1987;16(3):765-792.

52. Snyder P.J. Gonadotroph adenomas of the pituitary. Endocrinology rev. 1985;6:552-560.

53. Thorell J.I., Johansson B. Iodination using lactoperoxidase. Biochem Biophys Acta 1971:251-363.

54. Toms G.C., Mc Carthy M.J., Orten C.H., King T.T., Monson J.P. Predicting release after transphenoidal surgery for Cushing's disease. J. of Clinical Endocrinology Metabolism 1993;76(2):291-294.

55. Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieshlang E., Ross G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr. 1971;33:988.

56. Wass J.A.H., Williams J., Charlesworth M. Bromocriptine in management of large pituitary tumours. Med. J. 1982;284:1908-1911.

57. Wayne M. Dexamethasone suppression tests: usefulness simultaneous measurement of plasma cortisol and dexamethasone. Endocrinology 1982;16:401-408.

58. Williams R.H., Foster D.W., Wilson D.J. Endocrinología .Edit. Panamericana Buenos Aires 7a. edición 1989: 811-874.

59. Wisdom G.E. Enzyme immunoassay review. Clin Chem 1976;22(8):1243-1255.

60. Yallow R.S., Berson S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 1959;184:1648.

61. Zárate A., Canales E.S., Cano C., Castello J., Vázquez C., Loyo M. Manejo del adenoma hipofisario secretor de prolactina. Monografías Médicas. Junio 1982;118(6):215-222.

62. Zárate A., Lisci A., Loyo M., Vázquez C., Fonseca M.E. Pruebas dinámicas utilizadas para el diagnóstico de los adenomas hipofisarios. Rev. Med: IMSS.1982;20(6):700-706.