

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

Pruebas de Estimulación con ACTH Sintética para  
Diagnóstico Diferencial entre Insuficiencia  
Suprarrenal Primaria y Secundaria

T E S I S  
Q U E P A R A O B T E N E R  
E L T I T U L O D E  
*QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO*  
P R E S E N T A  
MARICELA MARIA DE JESUS PEÑA PALACIOS



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

AS Tesis 1977  
EQ 142316  
ECHA \_\_\_\_\_  
PROC 322  
329



## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE : MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO.  
VOCAL : GPE. LETICIA CARRASCO RIVERA.  
SECRETARIO : LUZ MA. HERNANDEZ BELTRAN.  
1er. SUPLENTE : ESTHER GUTIERREZ HIDALGO.  
2o. SUPLENTE : GENOVEVA ABDALA MATUK.

Sitio donde se desarrolló el tema : INSTITUTO NAL. DE CARDIOLOGIA.

Sustentante : PEÑA PALACIOS MARICELA MA. DE JESUS.

Asesor del tema : Q.F.B. RAMON GUEVARA ESTRADA. ( Q.P.D. )  
Q.F.B. GUADALUPE LETICIA CARRASCO RIVERA.

Supervisor técnico : DR. CARLOS POSADAS R.

CON TODO CARIÑO DEDICO ESTA TESIS

AL SR. DR. CARLOS POSADAS ROMERO ,  
QUE GRACIAS A SU VALIOSA DIRECCION,  
APOYO Y DEDICACION PUDO LLEVARSE -  
A CABO LA REALIZACION DE MI TESIS -  
PROFESIONAL.

A MIS ADORABLES PADRES,

LOS SEÑORES JUAN PEÑA CHAVEZ Y  
CONSUELO P. DE PEÑA CON TODO MI  
AMOR Y RESPETO, PORQUE SIEMPRE ME  
HAN GUIADO POR UN CAMINO RECTO  
Y VERDADERO EN EL TRANSCURSO DE  
MI VIDA.

CARIÑOSAMENTE A MI GRAN PRIMA :

LA DRA. SILVIA E. ORTIZ C.

A MI QUERIDO HERMANO,

EL DR. JUAN ANTONIO PEÑA PALACIOS.

GRACIAS A LOS LABORATORIOS DE  
MEDICINA EXPERIMENTAL DEL INSTITUTO  
NACIONAL DE CARDIOLOGIA; EN ESPE-  
CIAL AL DEPTO. DE ENDOCRINOLOGIA,  
POR BRINDARME TODAS LAS FACILIDADES  
EN LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO.

EN MEMORIA DEL SR. Q.F.B.

RAMON GUEVARA, CATEDRATICO DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO.

## SUMARIO

- I.- INTRODUCCION
- II.- GENERALIDADES.
- III.- MATERIAL Y METODOS.
- IV.- RESULTADOS.
- V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.
- VI.- BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION  
( I )

Hasta antes del advenimiento de la cortisona y los esteroides sintéticos, el diagnóstico de insuficiencia suprarrenal tenía una importancia casi exclusivamente académica puesto que, desde el punto de vista terapéutico, era bien poco lo que se podía ofrecer a estos pacientes para prolongar su vida y mantenerlos activos. La disponibilidad, primero de la cortisona y después de otros compuestos esteroides obtenidos mediante síntesis, ha cambiado radicalmente el pronóstico de los enfermos afectados por este padecimiento. En la actualidad, el establecer con precisión el diagnóstico de insuficiencia corticoadrenal es de una gran trascendencia dado que, -- con los avances terapéuticos logrados, el paciente puede llevar una vida prácticamente normal, con el único inconveniente de tener que recibir medicamento de por vida.

De lo anterior se desprende la importancia de disponer de pruebas específicas y al mismo tiempo prácticas que ayuden en forma efectiva a la elaboración del diagnóstico de insuficiencia suprarrenal, tales como -- las pruebas de estimulación con la Hormona Adrenocorticotrópica ( ACTH ).

Desde 1948, en que Thorn y col. ( 1 ) utilizaron la ACTH de origen animal, un gran número de autores ( 2,3,4 ) han informado diferen

tes formas y vías de administración de la hormona con el objeto de estudiar la respuesta suprarrenal. En general todas estas diferentes pruebas han sido de utilidad en su propósito de estudiar la reserva suprarrenal.

El uso del gel de ACTH administrada por vía intramuscular no ha tenido una aceptación adecuada debido a respuestas falso-positivas por absorción incompleta de la hormona a partir del sitio de administración (3).

El haber obtenido por síntesis un compuesto de cadena más corta que la ACTH natural pero con la misma actividad biológica y con absorción adecuada por vía venosa e intramuscular ha facilitado la evaluación de enfermos con sospecha de insuficiencia suprarrenal, mediante pruebas rápidas (5,6,7) y con mínimos riesgos de reacciones alérgicas. Al prolongar el efecto esteroideogénico del preparado sintético mediante su adsorción en zinc, se ha obtenido una sustancia capaz de estimular la corteza suprarrenal, de manera continua, por períodos de aproximadamente 24 hs. La uniformidad de su absorción por vía intramuscular y su larga acción corticotropa han hecho factible la realización de pruebas de estimulación prolongada que permiten la diferenciación entre la insuficiencia corticoadrenal primaria y la secundaria a trastorno hipofisario.

Debido a lo anterior, el objetivo principal de esta tesis es esta

blecer una diferencia clara entre los pacientes con insuficiencia suprarrenal primaria de aquellos con insuficiencia secundaria, mediante el empleo del - polipéptido sintético en el estudio de sujetos insuficientes suprarrenales, comparados contra los resultados obtenidos en sujetos clínicamente sanos.

GENERALIDADES  
( II )

## ANATOMIA Y FISIOLOGIA

Las glándulas suprarrenales, son órganos pares y como su nombre lo indica están situadas encima del polo superior de cada riñón. Normalmente pesan aproximadamente 5 g. cada una, miden 2.5 a 5 cm. de largo y tienen forma piramidal.

Cada glándula consta de dos porciones: la externa o corteza -- que procede del mesodermo y constituye aproximadamente 80% de su peso, en el adulto; es firme y de color amarillo oro y en ella se realiza la síntesis de hormonas corticosteroides, imprescindibles para la vida. La porción interior o médula procede del ectodermo, es de consistencia suave y de color café rojizo; pertenece al sistema simpático, por lo que no es indispensable para la vida ya que su función puede ser sustituida por otras estructuras nerviosas. La médula es el sitio de producción de catecolaminas: adrenalina, noradrenalina y dopamina.

Las glándulas suprarrenales están irrigadas por numerosos vasos -- que provienen de las arterias frénicas, la aorta, arterias renales y ocasionalmente por ramas del ovario o arterias intercostales; éstas penetran a la glándula a lo largo de trabéculas del tejido conectivo rompiéndose en una

cadena de capilares sinusoidales que se extienden radialmente en unas largas lagunas venosas en la médula. Las vénulas acumuladas a lo largo de la vena central corren sobre el eje de las glándulas y se vacían, en el lado izquierdo, en la vena renal y, en el lado derecho, en la vena cava inferior.

La corteza, histológicamente, presenta tres zonas anatómicas: la zona externa o glomerular, la zona media o fascicular y la zona interna o reticular.

La zona glomerular produce aldosterona, las zonas fascicular y reticular, aún cuando morfológicamente son diferentes, sintetizan cortisol, andrógenos y estrógenos (8).

Mediante el microscopio electrónico se ha podido estudiar las ultraestructuras celulares que hay en las diferentes zonas de la corteza (9). Durante la exposición prolongada de la suprarrenal a la Hormona Adrenocorticotrófica se observa un incremento en la actividad enzimática del metabolismo esteroideo; además hay aumento de RNA, DNA y enzimas del ciclo de Krebs en las células estimuladas (10).

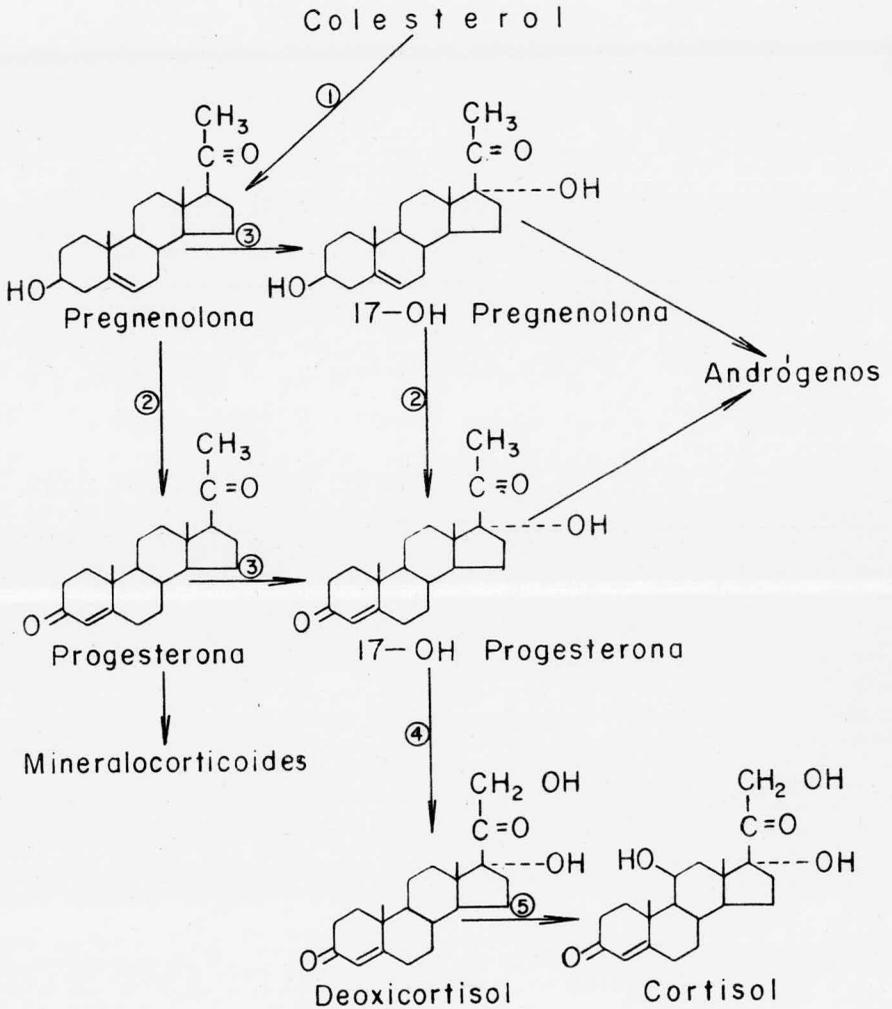
La ACTH, regula el crecimiento, la actividad estructural y la secreción esteroide de la corteza suprarrenal. Esta influencia reguladora, constantemente cambiante, se ejerce por acción de estímulos del Sistema -

Nervioso Central que llegan por caminos neurales al hipotálamo, el cual -- produce el "factor liberador de ACTH" ( C.R.F. ), que a su vez dá lugar, al actuar en las células de la hipófisis anterior, a la secreción de ACTH - ( 8 ). Bajo la influencia de la hormona, la corteza suprarrenal es capaz - de sintetizar colesterol y tomarlo de la circulación, y lo utiliza para la producción de hormonas esteroides por medio de numerosos procesos enzimáticos los cuales se muestran en la figura 1.

Los productos más importantes de síntesis son: la aldosterona, el - cortisol y sulfato de dehidroepiandrosterona, los cuales se agrupan de acuerdo a su actividad biológica en: glucocorticoides, mineralcorticoides y andrógenos ( 8 ).

Un posible mecanismo primario por medio del cual la ACTH puede provocar aumento en la producción de esteroides, consiste en la capacidad de la hormona para estimular la síntesis de fosforilasa en la corteza suprarrenal, elevando la concentración del monofosfato cíclico de adenosina -3',5' ( AMP cíclico ) en la glándula ( 11 ). El aumento de actividad de fosforilasa pone a disposición una cantidad mayor de glucosa 6-fosfato procedente de la vía de monofosfato de glucosa, lo cual proporciona mayores - cantidades de NADPH ( TPNH ), compuesto esencial para la síntesis y la - hidroxilación de esteroides.

Fig. 1.- Biosíntesis de cortisol.



- 1.- Sistemas 20-y 22-Hidroxilasa      desmolasa
- 2.- Sistemas  $\Delta^5$ - $3\beta$ Hidroxisteroide      dehidrogenasa - isomerasa
- 3.-  $17\alpha$ -Hidroxilasa
- 4.- 21-Hidroxilasa
- 5.-  $11\beta$ -Hidroxilasa

Existen tres mecanismos por los cuales se controla la secreción de ACTH y por lo tanto la producción de cortisol:

- 1) Mecanismo de Retroalimentación negativa
- 2) Ritmo circadiano y
- 3) Stress

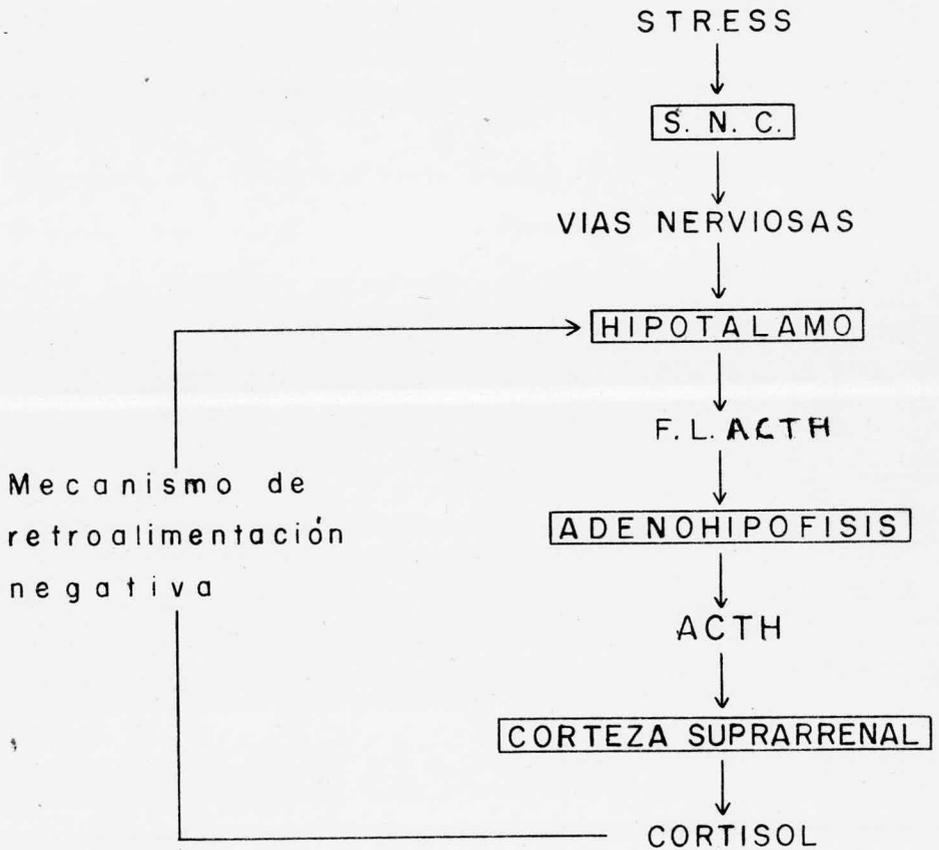
#### MECANISMO DE RETROALIMENTACION NEGATIVA:

Yates y col. ( 12 ), sugirieron que el control de la liberación de ACTH incluye un mecanismo de retroalimentación negativa en la que intervienen los corticosteroides sanguíneos ( Fig, 2 ). Si los niveles de cortisol plasmático son suprafisiológicos la secreción de ACTH se suprime, cesando la actividad secretora de la glándula suprarrenal hasta que los niveles de cortisol regresen a lo normal. Por otro lado, un descenso en el nivel de cortisol plasmático conduce a un aumento en la secreción de ACTH ocasionada muy probablemente por un incremento en la liberación de C.R.F. a nivel hipotalámico.

#### RITMO CIRCADIANO:

Se ha encontrado por muchos años que en sujetos normales que duermen en forma habitual las mismas horas diariamente, los niveles de cortisol plasmático muestran un patrón definido en el transcurso del día y la

Fig. 2.- Mecanismo de retroalimentación negativa y stress en la regulación de los niveles circulantes de cortisol



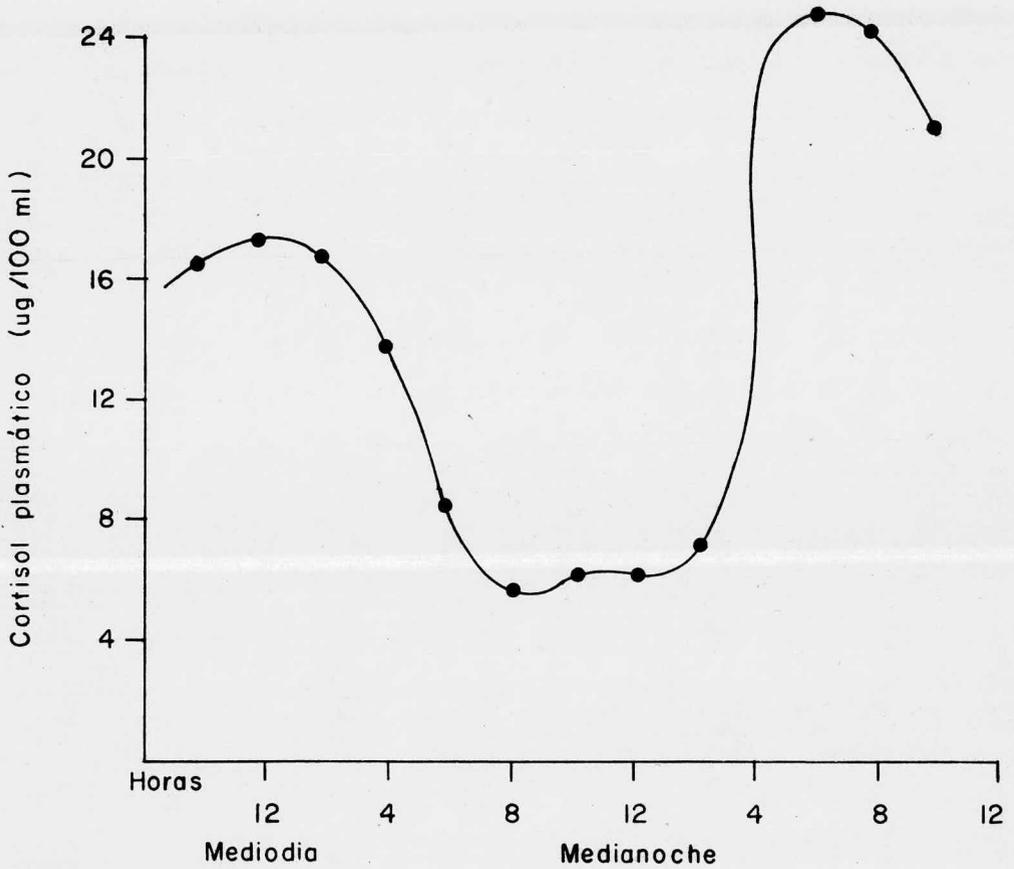
noche, en la Fig. 3 se observa que los niveles más altos ocurren entre las 6 y las 10 a.m. y los más bajos hacia la medianoche (13). El ritmo circadiano está determinado a nivel hipotalámico y, probablemente esta condicionado por una ritmicidad inherente de secreción de C.R.F. Los factores que controlan este ritmo no están bien establecidos, pero investigaciones recientes sugieren que el incremento en la secreción de ACTH en las primeras horas de la mañana está en relación a los hábitos de sueño-vigilia (14,15).

#### STRESS:

Está bien establecido que varias formas de stress, tales como: infecciones, cirugía, traumas, etc., causan un incremento en la concentración sanguínea de cortisol.

Debido a que el stress causa un incremento en la utilización de corticosteroides por los tejidos periféricos con la consecuente disminución de los niveles de corticosteroides sanguíneos, hace varios años (16) se sugirió que la hipocortisolemia constituía el estímulo para la liberación de ACTH por la hipófisis. Experimentos posteriores (17) sugirieron que la secreción de ACTH en respuesta al stress no se debía a un mecanismo de retroalimentación negativa, sino a un incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, mediado por el sistema nervioso central (18). Es importante señalar que el stress puede nulificar los otros dos factores que regu-

Fig.3.— Ritmo cicardiano de cortisol plasmático en sujetos normales (Mills, J. N. 1966)(13)



lan la secreción de ACTH.

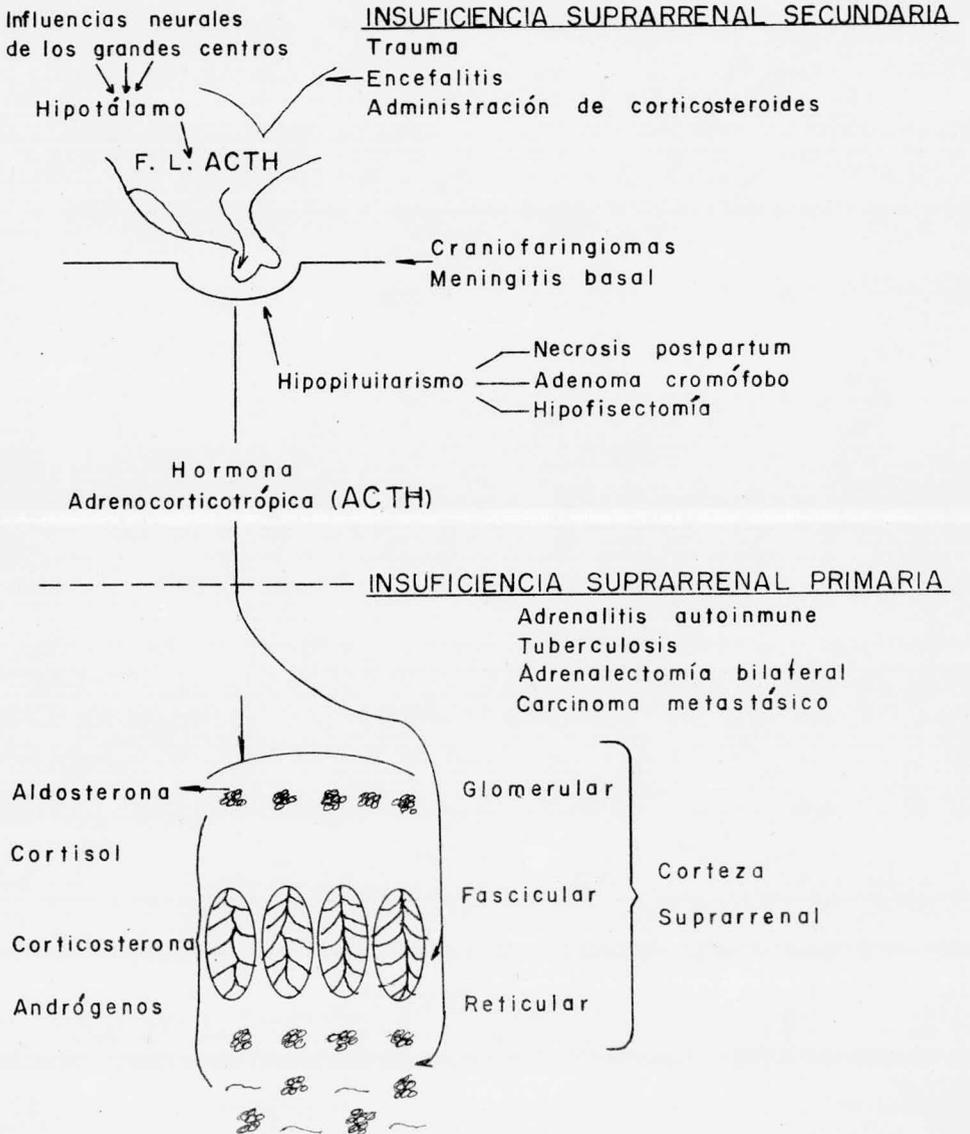
## PATOLOGIA DE LA CORTEZA SUPRARRENAL

La fisiología de las glándulas suprarrenales se puede alterar fundamentalmente de dos maneras: una es la hiperfunción, cuyo ejemplo típico es el Síndrome de Cushing, la otra, es la disminución en la producción de hormonas corticoadrenales y que clínicamente se conoce como Enfermedad de Addison. Además, existen otros trastornos como son: el Síndrome por exceso de producción de hormonas mineralcorticoides ( aldosterona, 11-desoxicorticosterona, corticosterona y 18-OH-11-desoxicorticosterona ), y el Síndrome Adrenogenital.

El Síndrome de Cushing ( 19 ) puede estar causado por trastornos en el eje hipotálamo-hipofisiario, por tumores de la hipófisis o de la misma glándula suprarrenal y por producción ectópica de ACTH.

El Síndrome Adrenogenital ( 20 ) habitualmente está asociado a deficiencias enzimáticas que impiden la síntesis de cortisol con la consiguiente hiperproducción de ACTH, lo que favorece la formación en grandes cantidades de esteroides con actividad mineralocortical y androgénica. Las alteraciones más comunes son las deficiencias de hidroxilación en las posiciones 11 y 21. En algunos casos el Síndrome Adrenogenital puede producirse como consecuencia de neoplasias benignas o malignas de la corteza su

Fig. 4. — Representación esquemática de la fisiología del eje hipotálamo-hipofiso-suprarrenal, y los sitios de acción de varias entidades patológicas que pueden alterarlo.



prarrenal.

La producción excesiva de aldosterona, es la causa más frecuente del Síndrome de exceso de mineralcorticoides. En la mayoría de los casos, el aumento de aldosterona circulante es debida a un adenoma corticoadrenal ( 21 ), y menos frecuentemente a hiperplasia ( 22 ) o a tumores malignos ( 23 ).

Insuficiencia suprarrenal.- La insuficiencia suprarrenal puede tener su origen en el hipotálamo, en la hipófisis y en la suprarrenal. En la fig. 4 se resumen las diferentes causas y el sitio donde actúan.

Quando la lesión se encuentra a nivel del eje hipotálamo-hipofisario, con deficiencia en la producción y liberación de ACTH, que conduce a atrofia de la corteza suprarrenal y a disminución importante de la síntesis de cortisol, se habla de insuficiencia suprarrenal secundaria ( I.S.S. ) ( 24 ). Más frecuentemente, este tipo de insuficiencia se presenta como resultado de la administración crónica de corticosteroides sintéticos a dosis suprafisiológicas.

La insuficiencia suprarrenal primaria ( I.S.P. ) ó enfermedad de Addison es debida a destrucción de la corteza suprarrenal ( 24 ). En países avanzados, hasta hace aproximadamente 15 años la causa más común de este padecimiento era la tuberculosis; pero con el avance logrado en el trata

tamiento antifímico gradualmente se ha observado una disminución en el número de insuficientes suprarrenales con etiología fímica y un aumento en la frecuencia de casos con atrofia idiopática de las suprarrenales (27). En México, aún cuando no existen estadísticas precisas, se tiene la impresión de que, al igual que en otros sitios del mundo, la insuficiencia suprarrenal de origen tuberculosos ha disminuído en forma notable.

Como se mencionó anteriormente, en la I.S.S., hay lesión del eje hipotálamo-hipofisiario y consecuentemente deficiencia en la producción de ACTH, lo que conduce a la atrofia de la corteza suprarrenal y a disminución de los niveles circulantes de cortisol. Por el contrario, en la I.S.P., la lesión ha destruído a las glándulas suprarrenales, lo que dá lugar a bajos niveles circulantes de cortisol que no logran frenar la producción de ACTH y, por lo tanto, éste se encuentra elevada en la sangre (28).

Clínicamente los pacientes con insuficiencia suprarrenal con frecuencia presentan: anorexia, náuseas, vómitos, pérdida de peso y astenia. Los enfermos con I.S.P. presentan además hiperpigmentación generalizada, pero más notable en zonas expuestas a la luz, presión o fricción como son: cara, codos, rodillas y líneas de la cintura (28); también pueden tener manchas hipercrómicas en las mucosas conjuntival, oral y vaginal. Como la

hiperpigmentación es debida al aumento en las concentraciones sanguíneas de ACTH y de la hormona estimulante de los melanocitos ( MSH ) ( 26 ), este signo no se presenta en los pacientes con I.S.S.; en quienes existe deficiencia de producción de éstas hormonas.

Las manifestaciones clínicas de la insuficiencia suprarrenal son -- muy inespecíficas, ya que pueden presentarse en un buen número de padecimientos. Por lo tanto, aún cuando el cuadro clínico parezca muy característico, es indispensable realizar pruebas de laboratorio, a fin de establecer un diagnóstico preciso.

#### PRUEBAS DE LABORATORIO

Desde este punto de vista existen datos que sugieren el diagnóstico y otras que lo confirman. Dentro de las primeras se encuentra la hipercalcemia, hiponatremia, hipoglicemia, aumento de las concentraciones séricas de urea y del número absoluto de eosinófilos. En el segundo grupo de datos se encuentran los relacionados a las concentraciones plasmáticas o urinarias de cortisol o de 17-hidroxicorticosteroides en condiciones basales y después de estimulación.

Las determinaciones hormonales practicadas en forma aislada y en condiciones basales, no son confirmatorias del diagnóstico de insuficiencia suprarrenal, pues un número importante de pacientes con este padecimiento

puede cursar con valores normales (25). Por lo tanto, este tipo de mediciones siempre deberán complementarse con determinaciones efectuadas después de estimulación con ACTH.

El diagnóstico de I.S.S. se establece demostrando que las concentraciones de cortisol en sangre, o de metabolitos de cortisol en la orina son normales, bajos o subnormales en condiciones basales, y aumentan gradual y progresivamente en respuesta a la administración repetitiva de ACTH durante tres o más días. La insuficiencia suprarrenal primaria se distingue fácilmente de la secundaria por la ausencia de aumento de los esteroides plasmáticos o urinarios cualquiera que sea la dosis o la duración de la administración con ACTH (4).

La reciente introducción de técnicas para determinar las concentraciones plasmáticas de ACTH, ha proporcionado un nuevo método para definir el carácter primario o secundario de la insuficiencia suprarrenal. En la enfermedad de Addison, los niveles circulantes de ACTH se encuentran muy elevados (26); por el contrario, los valores de esta hormona son muy bajos o indetectables en los casos con insuficiencia secundaria a lesión hipotálamo-hipofisiaria (24).

#### PRUEBAS DE ESTIMULACION SUPRARRENAL

La estructura química de la ACTH se ha determinado en varios ti



pos de mamíferos ( 29 ). La figura 5 muestra la estructura de la ACTH humana. En todas ellas se ha encontrado que la hormona es un polipéptico de 39 aminoácidos, la porción constituida por los primeros 24 aminoácidos llamada N terminal, es similar en todas las especies, pero hay variaciones en la secuencia de la porción denominada C-terminal, constituida por los últimos 15 aminoácidos ( 30,26 ). Todas las variedades de ACTH que han sido perfectamente purificadas, han mostrado potencia biológica semejante, aproximadamente 100 UI/mg.

Los estudios experimentales han demostrado que la actividad esteroideogénica de la ACTH reside en la porción N-terminal de su molécula, y que el efecto antigénico de la hormona está dado por la porción C-terminal ( 5 ).

Fué Thorn y col. en 1948 ( 1 ), quienes por vez primera estimularon la corteza suprarrenal con ACTH exógena. Desde esa fecha varios autores han recomendado diferentes métodos para realizar la prueba, utilizando la ACTH de origen animal, principalmente la bovina y la porcina. Las diferencias entre los diferentes métodos están relacionadas a la cantidad de ACTH administrada, la vía, el tiempo de administración y los tipos de valoración de la respuesta.

El método más utilizado a lo largo de los años ha sido la infu---

sión de 20 o 40 unidades de ACTH simple en 500 ml de solución salina durante 8 hs. y por 3 días consecutivos, durante los cuales se determinan los 17-hidroxicorticosteroides en orina de 24 hs. (2)

Otro método frecuentemente empleado (3) consiste en la administración de 60 ó 120 unidades de un gel de ACTH por vía intramuscular cada 12 hs. durante 3 días. La respuesta, al igual que en el método anterior, es valorada de acuerdo a la concentración de 17-hidroxicorticosteroides encontrados en la orina de 24 hs. colectada en los días de estimulación.

Estas pruebas de estimulación han sido de gran utilidad en el estudio de pacientes con insuficiencia suprarrenal. Sin embargo, el método de infusión tiene el inconveniente de que el paciente tiene que ser hospitalizado durante los días de prueba. Además, debido al origen animal de la hormona utilizada se pueden presentar graves reacciones anafilácticas (31,32 - 33) después de la administración de este tipo de ACTH.

La vía intramuscular tenía el inconveniente adicional de una absorción incompleta en algunos pacientes lo que daba lugar a resultados falsos positivos de la prueba (1). Otro inconveniente de la ACTH animal es su estandarización por bioensayo.

El éxito logrado en la síntesis de la ACTH, ha proporcionado un

compuesto puro de cadena más corta que la ACTH natural ya que ésta tiene 39 aminoácidos y el compuesto sintético sólo los primeros 24, conservando su actividad biológica y eliminando la porción antigénica, contenida en los últimos 15 aminoácidos de la cadena de la hormona de origen biológico (5), (Fig. 6). Este compuesto sintético tiene como ventajas el de ser químicamente puro, lo que teóricamente permitiría reducir el riesgo de reacciones alérgicas (34), altamente soluble en agua y de que su estandarización es en unidades de masa.

Varios estudios clínicos (6,35) han mostrado que la alfa 1-24-ACTH se absorbe rápidamente por vía intramuscular, tiene un efecto esteroideogénico que aparece pocos minutos después de la inyección, y dura únicamente de 3 a 4 hs. Las características del compuesto sintético han sido de gran utilidad en pruebas cortas de estimulación para distinguir rápidamente a los sujetos normales de aquellos con insuficiencia suprarrenal (6,36). Sin embargo, estas pruebas rápidas no permiten establecer una diferencia clara entre los pacientes con I.S.P. de aquellos con I.S.S.

La adsorción en fosfato de zinc del polipéptido sintético, le ha conferido, la ventaja adicional de una duración prolongada de su efecto (37). Se ha demostrado que la acción adrenocorticotropa de este compuesto es semejante a la del gel de ACTH cuando se administra en dosis equiva

lentes (38), alcanza su máximo entre las 6 y 12 hs. y se puede todavía - seguir observando 24 hs. después de su aplicación por vía intramuscular ( - 37).

Este efecto esteroideogénico prolongado y la uniformidad de su ab-  
sorción del sitio de aplicación intramuscular, han hecho de este compuesto  
una sustancia muy útil para llevar a efecto pruebas de estimulación durante  
2 ó 3 días consecutivos, obteniéndose respuestas suprarrenales similares a --  
las observadas después de 8 hs. de infusión intravenosa de ACTH repetida -  
cada 24 hs. por el mismo número de días. Puesto que la aplicación es in--  
tramuscular, la prueba con la tetracosactrina tiene además la ventaja de --  
que se puede realizar en pacientes no hospitalizados, lo que facilita su rea  
lización y disminuye en forma importante su costo.

MATERIAL Y METODOS  
( III )

## MATERIAL BIOLÓGICO

Se estudiaron a un total de 17 personas, que se dividieron en -- tres grupos:

- A) Personas clínicamente sanas, formado por ocho personas del laboratorio donde se llevó a cabo el estudio, cuatro del sexo femenino y cuatro del sexo masculino.
- B) Pacientes con enfermedad de Addison ( I.S.P. ) constituido por cinco personas, cuatro del sexo masculino y una del sexo femenino.
- C) Pacientes con insuficiencia secundaria ( I.S.S. ) comprendido por cuatro pacientes femeninos.

En cada uno de los pacientes de los grupos B y C se había diagnosticado y confirmado los padecimientos por pruebas específicas de función renal, cuya especificidad al padecimiento ha sido debidamente comprobada.

Las muestras consistieron en:

- a).- PLASMA SANGUÍNEO. Para la determinación de 11-OHCS se recogen a cada individuo 15 ml de sangre en tubos heparinizados, en las condiciones "BASAL Y DE ESTIMULACION" más adelante descritas, - las sangres se mezclan cuidadosamente, para evitar la hemólisis; se -

centrifugan inmediatamente para separar el plasma; distribuido en alícuotas de 5 ml que se mantienen en congelación hasta el momento del análisis, que si se realiza antes de 24 hs. se puede conservar en refrigeración.

Este muestreo se realiza a las 9 y a las 16 horas el día de iniciación de la prueba en la que se cuantifican los niveles basales de 11-OHCS; así como a las mismas horas en cada uno de los 3 días siguientes en que se realiza una estimulación aplicando la ACTH; las muestras deberán ser etiquetadas convenientemente a fin de reconocerlas con facilidad.

- b).- **ORINA DE VEINTICUATRO HORAS:** Las muestras se utilizan para la medición de 17-OHCS y de creatinina, la recolección se realiza de 9 a.m. a 9 a.m. de días cotidianos, sin adicionar preservativos.

#### PRUEBA BASAL Y DE ESTIMULACION:

En todos los casos, de personas clínicamente sanas y de I.S.P. e I.S.S., se realizan pruebas denominadas **BASALES**, aquellas en que las concentraciones de 11-OHCS y 17-OHCS, se hacen en condiciones fisiológicas de cada paciente, en plasma y orina. Las pruebas llamadas de **ESTIMULACION**, se denominan, a aquellas que se realizan una vez administrada la ACTH, para cuantificar los 11 y 17-OHCS, también en plasma y orina. La

estimulación se hace rutinariamente a las 9 horas de cada uno de los tres días siguientes, administrando por vía intramuscular 1 mg. de ACTH sintética de producción farmacéutica ( Laboratorios Organon ) con el zinc ya incorporado como adsorbente a fin de liberar lentamente la hormona.

#### MATERIAL QUIMICO Y DE LABORATORIO:

Se enumerará al describir las técnicas de cuantificación.

Las lecturas del fluorescencia se realizaron en el espectrofotofluorómetro Aminco Bowman equipado con lámpara de hidrógeno.

#### TECNICAS DE CUANTIFICACION:

##### 17-OHCS.-

Fundamento.

Los 17-OHCS se cuantificaron por el método colorimétrico de Porter Silver ( 39 ) que se basa fundamentalmente en la formación de un pigmento amarillo ( máximo de absorción a 410 nm ) cuando ciertos corticosteroides reaccionan con fenilhidracina en presencia de alcohol y ácido sulfúrico.

Cálculos.

Los cálculos se obtienen mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mg/24 hs.} = \frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. patrón}} \times \text{Conc. del patrón} \times \frac{\text{Vol. Total}}{8}$$

Los resultados se reportan en mg/g de creatinina debido a que la creatinina es de origen endógeno y no se reabsorbe por los túbulos, y su -- eliminación en una persona dada es relativamente constante.

### Creatinina.-

La creatinina se determinó en autoanalizador ( Technicon ) por el método de Folin.

### 11-OHCS.-

#### Fundamento.

Los 11-OHCS se determinaron por el procedimiento fluorométrico descrito por Mattingly ( 40 ) que consiste fundamentalmente en una extrac--  
ción con diclorometano de los esteroides del plasma alcalinizado; estos son tratados con una mezcla ácido sulfúrico-alcohol absoluto, para llevar a ca--  
bo el desarrollo de la fluorescencia la cual se realiza 17 minutos después --  
de haber agregado la mezcla; comparándose con la fluorescencia de una so--  
lución de cortisol de concentración conocida y tratada de la misma manera.

El método consiste en procesar por duplicado, tanto las concentra--  
ciones patrones de cortisol como las muestras problema.

#### a) Extracción:

1.- En tubos tipo Kober numerados en forma apropiada, se po--

nen 2.0 ml del plasma en estudio. Si la cantidad de plasma es insuficiente se usa 1.0 ml y se agrega 1.0 ml de agua bidestilada.

Como blancos se utilizan 2.0 ml de agua bidestilada. Para los patrones se colocan 0.2, 0.4 y 0.6 ml de una solución patrón de cortisol diluída de 1.0 ug/ml y se aforan a 2.0 ml con agua bidestilada ( estas diluciones corresponden a concentraciones de 10,20 y 30 ug% ).

2.- A todos los tubos patrones, blancos y muestras de plasma, - se agrega 0.2 ml de hidróxido de sodio 1.0 N y se mezcla muy suavemente.

3.- En forma cuidadosa se agregan 15 ml de diclorometano a los tubos, se invierten lentamente 30 veces.

4.- Se deja reposar 10 minutos y se descarta la fase acuosa.

b).- Desarrollo de la Fluorescencia;

5.- Transferir 10 ml. del extracto de diclorometano ( capa inferior ) a un tubo limpio similamente numerado.

6.- Se agregan 5 ml de mezcla ácido sulfúrico-etanol ( 7:3 vol /vol ), comenzando con el tubo que contiene 30 ug% y continuando con el de 20 ug%, 10 ug%, las muestras y, finalmente los blancos. Los tubos se mezclan en el vortex durante 20 segundos. A partir de este paso 6, los tubos se trabajan en grupos de ocho. La mezcla de ácido sulfúrico alcohol ab

soluto se agrega a los tubos a intervalos de 1 minuto. Un blanco adicional es necesario para cada grupo de ocho tubos.

7.- Descartar la fase de diclorometano mediante succión ( fase superior ).

8.- Leer la fluorescencia en el espectrofotofluorómetro 17 minutos después de que se agregó la mezcla, siguiendo el mismo orden del paso 6 y conservando los mismos intervalos de tiempo. La máxima fluorescencia de cortisol es por excitación a 465 nm y la emisión a 520 nm.

#### Calibración del espectrofotofluorómetro.-

- 1.- Encender el aparato 20 minutos antes de comenzar las lecturas.
- 2.- Ajustar a la máxima sensibilidad con una solución de sulfato de quinina a  $40 \times 0.03$  y longitud de onda de excitación a 350 nm y de emisión a 450 nm.
- 3.- Una vez ajustado el aparato se cambia a la longitud de onda específica para leer el cortisol, llevando a cero con agua destilada.

#### Cálculos.-

Trazar una curva con las lecturas de los patrones ( concentración vs. fluorescencia ) después de corregir las lecturas restando a cada una de ellas el valor obtenido por el blanco, y leer directamente en la curva los valores de las muestras problema ya corregidas.

Para obtener resultados satisfactorios con esta técnica se deberá -  
cuidar que todos los reactivos utilizados sean de alto grado de pureza.

RESULTADOS  
( IV )

La especificidad del método de fluorescencia utilizado en este trabajo, ha sido estudiada por varios autores ( 41,42 ). En la tabla I se muestran los resultados obtenidos por Mattingly ( 40 ) en el estudio de varios compuestos esteroides.

La precisión del método fué estudiada para este trabajo, determinando el coeficiente de variación intraanálisis de cinco concentraciones diferentes de cortisol. Los resultados se muestran en la tabla II. En dos muestras de plasma en las que se practicaron 18 y 16 determinaciones por duplicado en diferentes días, el valor medio fué de  $16.3 \pm 0.60$  ( D.E. ) y  $7.10 \pm 0.90$  ( D.E. ) lo que corresponde a un coeficiente de variación interanálisis de 3.68 y 12.67 respectivamente.

En las figuras 8 y 9 en las tablas III y IV se ilustran los valores del cortisol plasmático y de los 17-OH urinarios antes y después de la administración del polipéptido sintético en los tres grupos de sujetos estudiados. En las figuras y tablas los resultados están expresados en su valor medio  $\pm$  el error estándar.

Con el objeto de observar con mayor claridad el efecto de la ACTH, en la fig. 10, se muestran únicamente los valores basales y los ob-

tenidos en el tercer día de estimulación. Es evidente que el valor obtenido después de la administración de la ACTH sintética de acción prolongada - durante 3 días, es claramente distinto para cada uno de los grupos de sujetos, permitiendo la diferenciación entre normales y enfermos, así como entre los dos tipos de insuficiencia suprarrenal.

TABLA I.- Fluorescencia de diferentes esteroides, expresada como porcentaje de la fluorescencia del cortisol (Mattingly, D. 1962)

| Esteroides (2mg)                 | %     |
|----------------------------------|-------|
| Cortisol                         | 100.0 |
| Corticosterona                   | 252.0 |
| Cortisona                        | 0.0   |
| Tetrahidro -cortisol             | 5.0   |
| 11 - Deoxicortisol               | 2.8   |
| Prednisona                       | 1.4   |
| Prednisolona                     | 0.0   |
| Metilprednisolona                | 2.6   |
| Fluorcortisona                   | 2.9   |
| Acetonida de triamcinolona       | 2.1   |
| Dexametasona                     | 0.0   |
| Acetato de parametasona          | 0.0   |
| Betametasona                     | 0.0   |
| Fosfato disodico de betametasona | 0.0   |
| Triamcinolona                    | 1.2   |
| Estriol                          | 2.3   |
| Estrona                          | 6.0   |
| Estradiol                        | 23.2  |

TABLA II. - Coeficientes de variación de determinaciones por duplicado a diferentes concentraciones de cortisol.

| Número de determinaciones por duplicado | Concentración de 11-OH plasmático (ug/100ml) | C. V. (%) |
|---|--|-----------|
| N = 162                                 | 0 - 9.9                                      | 15.6      |
| N = 97                                  | 10 - 19.9                                    | 9.1       |
| N = 38                                  | 20 - 29.9                                    | 7.0       |
| N = 34                                  | 30 - 39.9                                    | 4.6       |
| N = 54                                  | 40 - 73.0                                    | 4.7       |

Fig.8.— Respuesta del cortisol plasmático a la administración de 1mg. diario de ACTH sintética de acción prolongada en sujetos normales (a) y en pacientes con insuficiencia suprarrenal secundaria (b) y primaria (c)

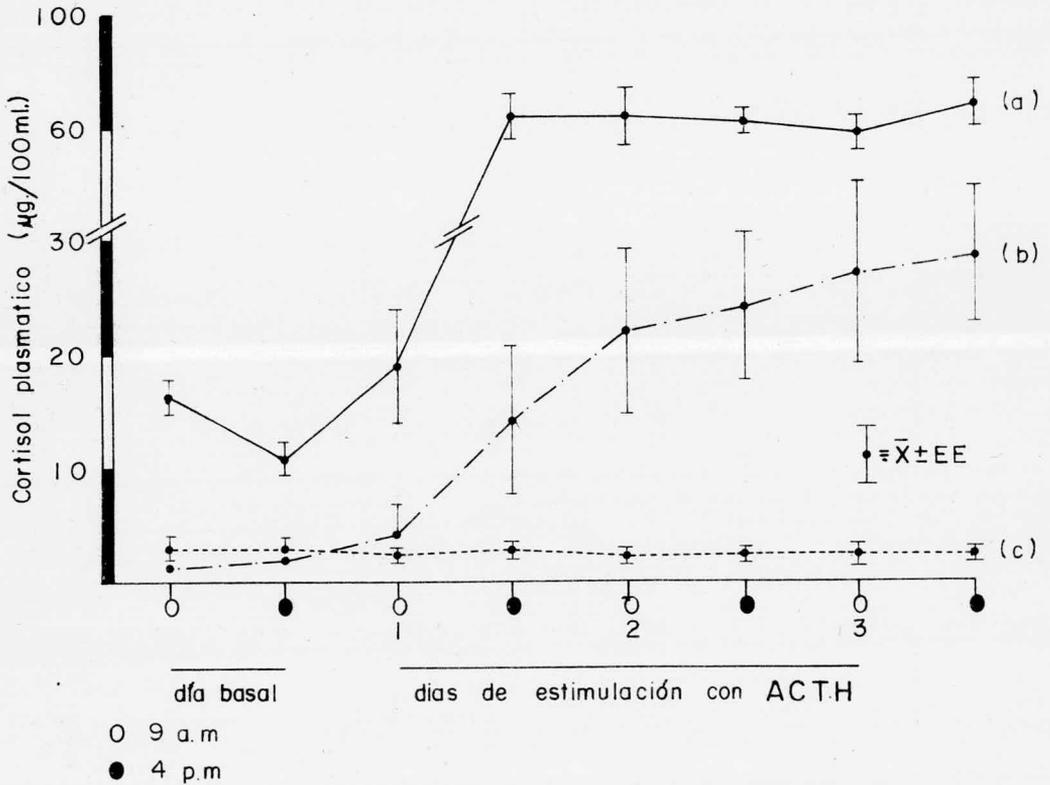


Fig. 9.- Respuesta de los 17-OH urinarios a la administración de 1mg. diario de ACTH sintética de acción prolongada en normales (a) y en pacientes con I.S.S (b) y primaria (c)

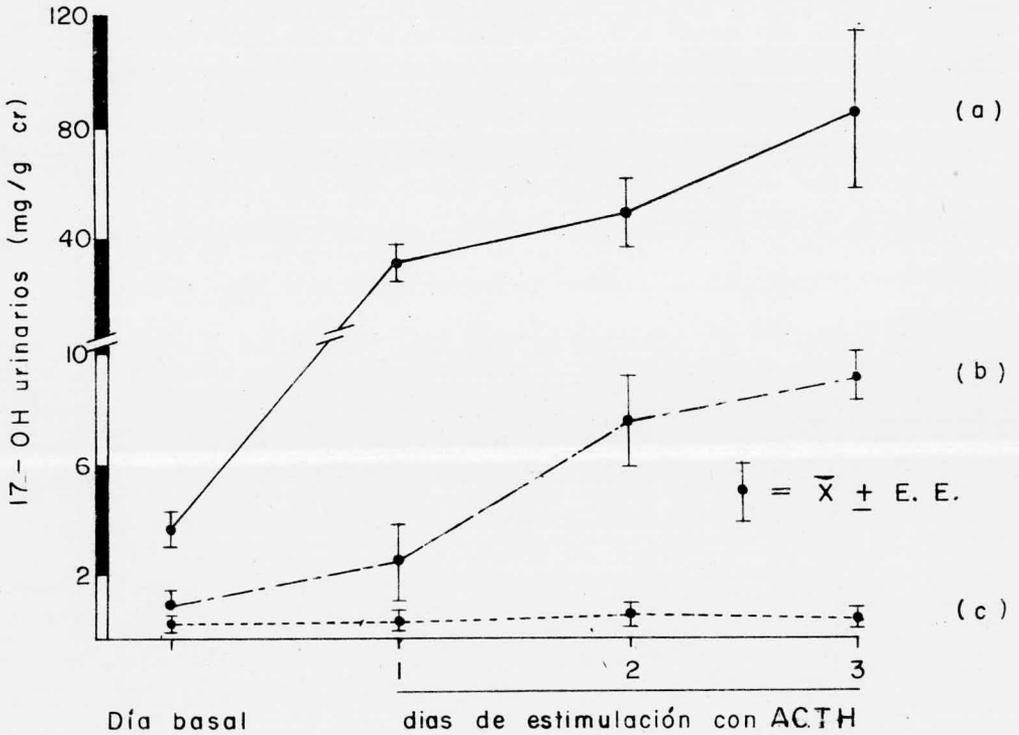


TABLA III.— Cortisol plásmatico antes y durante la administración de 1mg. diario de ACTH sintética de acción prolongada en tres días consecutivos.

| SUJETOS                                    | VALORES<br>BASALES |             | Días de administración de la ACTH |            |            |            |            |            |
|--|--------------------|-------------|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|  |                    |             | 1                                 |            | 2          |            | 3          |            |
| Normales                                   | 16.4 ± 1.77        | 11.5 ± 1.47 | 19.1 ± 5.3                        | 64.8 ± 8.4 | 64.8 ± 9.7 | 60.3 ± 4.6 | 57.7 ± 6.5 | 68.2 ± 7.9 |
| Insuficiencia<br>Suprarrenal<br>Primaria   | 2.7 ± 1.0          | 2.4 ± 0.48  | 2.1 ± 0.59                        | 2.6 ± 0.68 | 2.2 ± 0.59 | 2.3 ± 0.61 | 2.3 ± 0.59 | 2.6 ± 0.74 |
| Insuficiencia<br>Suprarrenal<br>Secundaria | 1.1                | 2.1         | 4.3 ± 3.1                         | 13.9 ± 6.8 | 22.0 ± 6.9 | 24.3 ± 6.6 | 26.9 ± 8.1 | 28.7 ± 6.2 |



■ = Muestra de las 9.00 a.m.

□ = Muestra de las 4.00 p.m.

Los valores indican media ± error estándar

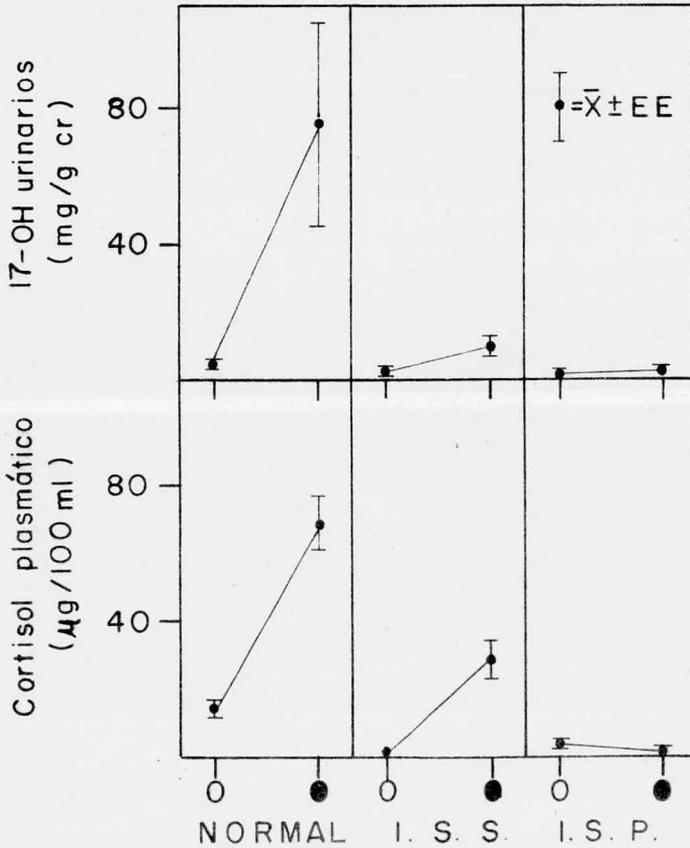
Los resultados se expresan en ug./100ml.

TABLA IV- Excreción urinaria de 17-hidroxicorticosteroides antes y durante la administración de ACTH sintética de acción prolongada.

| SUJETOS                                    | NIVELES<br>BASALES | Días de administración de la ACTH |             |             |
|--|--------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|
|  |                    | 1                                 | 2           | 3           |
| Normales                                   | 3.8 ± 0.64         | 33.6 ± 6.0                        | 51.5 ± 12.3 | 77.1 ± 29.0 |
| Insuficiencia<br>Suprarrenal<br>Primaria   | 0.34 ± 0.24        | 0.61 ± 0.38                       | 0.75 ± 0.43 | 0.73 ± 0.4  |
| Insuficiencia<br>Suprarrenal<br>Secundaria | 1.1 ± 0.7          | 2.7 ± 1.39                        | 7.6 ± 1.68  | 9.3 ± 0.82  |

Los valores indican media ± error estandar  
 Los resultados se expresan en mg/gr Cr.

Fig. 10.— Prueba de estimulación suprarrenal con ACTH sintética de acción prolongada. En la figura se indican unicamente los valores obtenidos en el día basal (O) y en el día último (●) de estimulación.



DISCUSION Y CONCLUSIONES  
(V)

El método fluorométrico utilizado en este estudio para medir los 11-OHCS plasmáticos, detecta además del cortisol, la corticosterona y posiblemente el 20-OH cortisol (40), así como fluorógenos inespecíficos. Esto no parece representar un inconveniente de importancia para su uso clínico, puesto que se ha encontrado (43) que los cambios en las concentraciones de cortisol plasmático se reflejan con exactitud en los cambios de la fluorescencia total; por lo tanto, aunque no tiene la especificidad de las técnicas inmunoisotópicas, es un procedimiento rápido y accesible por su fácil metodología y porque no requiere personal ni equipo especializados.

Con la dosis empleada de ACTH sintética, los sujetos normales refirieron manifestaciones de toxicidad, posiblemente debido a hipercorticismismo agudo desde el primer día, tales como náuseas, palpitaciones, ansiedad o euforia alternada con depresión, debilidad muscular y discreta elevación de la tensión arterial. En algunos de ellos estas manifestaciones clínicas fueron intensas y obligaron a suspender la prueba, en dos sujetos el primer día y en otros dos el segundo día, terminándola en forma completa sólo cuatro de los sujetos normales. Estas manifestaciones no se observaron en los pacientes con insuficiencia primaria o secundaria lo que apoya la interpretación de -

toxicidad por posible hipercorticismismo agudo iatrogénico. En ninguno de los su jetos estudiados hubo manifestaciones de alergia a la ACTH empleada.

Debido a lo anterior, y al hecho de haber alcanzado rápidamente una respuesta importante en los normales, creemos que la dosis de 1 mg de ACTH sintética, equivalente aproximadamente a 100 U de la natural, re ulta elevada cuando hay buena reserva corticoadrenal, en cambio, es adecuada para dilucidar entre una insuficiencia primaria y una secundaria.

En los sujetos normales el valor basal de cortisol plasmático fué - de 16.4 ug/100 ml a las 9 hs; y de 11.5 ug/100 ml a las 16 hs. Este valor aumentó rápidamente el primer día de estimulación a 64.8 ug/100 ml, man teniéndose esta concentración prácticamente en el mismo nivel durante los - dos últimos días de la prueba.

En los sujetos con I.S.P. no se observó aumento significativo de cortisol, con relación a los niveles basales ( 2.7 ug/100 ml ).

Los pacientes con insuficiencia corticoadrenal secundaria mostra-- ron niveles basales de cortisol bajos, semejantes a los addissonianos de 1.1 ug/100 ml a las 9 hs. y de 2.1 ug/100 ml a las 16 hs., pero a diferencia de éstos, tuvieron un aumento gradual y progresivo de las concentraciones - hormonales, que se observó desde el primer día de estimulación y fué muy - evidente en los días segundo y tercero llegando a 28.7 ug/100 ml. Es impor

tante que las cifras observadas no igualaran a las encontradas en los sujetos normales.

En el grupo de normales los 17-OHCS se encontraron en 3.8 --- mg/g de creatinina en condiciones basales, aumentando el primer día de estimulación a 33.6 mg/g de creatinina; los aumentos mayores con cifras hasta de 77.1 mg/g de creatinina se observaron durante las últimas 48 hs. de estimulación.

En los pacientes con I.S.P. los 17-OH, al igual que el cortisol, se mantuvieron en cifras semejantes a los niveles basales que fueron de 0.34 mg/g de creatinina,

Los pacientes con I.S.S., con niveles basales también bajos, tuvieron aumentos graduales y progresivos a partir del primer día de estimulación alcanzando un valor de 9.3 mg/g de creatinina el último día de aplicación de la ACTH. Este patrón de respuesta fué similar al observado con el cortisol plasmático.

Los sujetos normales tuvieron una respuesta inmediata desde el primer día, con un incremento medio sobre la cifra basal de 45 ug/100 ml de cortisol en plasma y en 17-OH urinarios de 30 mg/g de creatinina; en contraste, los pacientes con insuficiencia suprarrenal primaria, con niveles basales bajos o en límites normales inferiores, no respondieron al estímulo, --

manteniendo prácticamente los mismos niveles hormonales durante toda la fase de estudio; en cambio, los enfermos con insuficiencia secundaria cuyos niveles basales fueron también bajos, tuvieron el primer día un incremento de 9 ug/100 ml de cortisol y de 1.6 mg/g de creatinina en los 17-OHCS, para seguir un ascenso gradual y mostrar al tercer día de estimulación, incrementos de 24 ug/100 ml de cortisol en plasma y de 8.2 mg/g de creatinina de 17-OHCS en orina, en relación a la concentración basal, el valor final fué claramente inferior al alcanzado por los normales, correspondiendo a 42 y 12% de los valores en cortisol y 17-OH observados en los sujetos sanos.

Se puede concluir, que la prueba de estimulación descrita es de gran utilidad para establecer un diagnóstico en cuanto al grado y tipo de insuficiencia, debido a:

- 1.- Que la dosis empleada es adecuada para distinguir claramente a los enfermos con insuficiencia corticosuprarrenal primaria de aquellos con insuficiencia secundaria a trastorno hipofisario, solo que resulta elvada por sus manifestaciones de hipercorticismismo en los sujetos normales.
- 2.- Que el efecto del polipéptido sintético adsorbido en zinc administrado por vía intramuscular es más continuo y prolon

gado que la infusión endovenosa de ACTH sintética simple, permitiendo la estimulación durante 3 días con mínimos riesgos de producir fenómenos alérgicos.

- 3.- Finalmente, no obstante el corto número de casos estudiados, puede observarse que la respuesta encontrada en sujetos normales, comparada con la de los pacientes con insuficiencia primaria y secundaria es diferente y notablemente característica para cada grupo, lo que le confiere a la prueba un firme valor diagnóstico y gran utilidad práctica.

BIBLIOGRAFIA  
( VI )

- 1.- Thorn G.W.; Forsham, P.H.; Prunty, F.T.G; y Hill, A.G.  
A test for adrenocortical insufficiency  
Journal American Med. Ass. 137: 1005 ( 1948 )
- 2.- Renold, A.E. ; García-Reyes, J: y Jenkins, D.  
The intravenous ACTH test  
J.Clin Invest. 31: 657 ( 1952 )
- 3.- Navarro, J. D.N.  
The use of corticotrophin gel as a test of adrenal cortical function.  
Lancet 2: 1101 ( 1954 )
- 4.- Jenkins, D; Forsham, P.H.; Laidlaw, J.C. et al.  
Use of ACTH in the diagnosis of adrenal cortical insuficiency.  
Am. J. Med. 18: 3-14 ( 1955 )
- 5.- Wood, J.B.; Frankland, A.W.; James, V.H.T. et al.  
A rapid test of acrenocortical function  
Lancet 1: 243 ( 1965 )
- 6.- Posadas, C.R; Magos, C.L; Chávez, R.O; Cuellar, A. y Serrano.P.A.  
Empleo de la Alfa-1-24-ACTH para prueba rápida de estimulación suprarrenal.  
Rev. Invest. Clínica 26: 243 ( 1974 )
- 7.- Hawley, W.D; Verster, F.B; Vega de R.C.; Schally, A.V. y Bowers, C.Y.  
A simple twenty four hour test to evaluate hypothalamus pituitary-adrenal cortical function  
J. Clin. Endocrin 28: 558 ( 1968 )
- 8.- Ganong, W.F. et al.  
ACTH ant the regularion of adrenocortical secretion.  
N. Engl. J. Med. 290: 1006-11 ( 1974 )

- 9.- Dobbie J. W.; Mackay, A.M. y Symington T.  
The structure and functional zonation of the human adrenal cortex.  
Memoirs of the Society for Endocrinology No. 17  
The Investigation of Hypothalamic-pituitary-adrenal function p.- 103  
( 1967 )
- 10.- Farese, R.V.; y Reddy, W.J.  
Effect of adrenocorticotrophin on adrenal protein synthesis  
Endocrinology 73: 294 ( 1963 )
- 11.- Grahame-Smith, D.G.; R.W. Butcher, R.L. Ney y E.W. Sutherland  
Adenosine-3',5--monophosphate as an intracellular mediator of action  
of adrenocorticotrophic hormone on the adrenal cortex.  
J. Biol. Chem. 242: 5535 ( 1967 )
- 12.- Yates, I.E.; Leeman, J.E.; Glenister, D.W. y Dallman, M.F.  
Interaction between plasma cortocosterone concentration and adreno--  
corticotrophin-releasing stimuli in the rat. Evidence fot the reset of on  
endocrine feedback control.  
Endocr. 69: 67 ( 1961 )
- 13.- Mills, J.N.  
Human circadian rhythms  
Physiol. Rev. 46: 128-71 ( 1966 )
- 14.- Hellman, L; Nakada, F; Curti, J; Weitzman, E.D.; et al.  
Cortisol is secreted episodically by normal man  
J Clin. Endocr 30: 411 ( 1970 )
- 15.- Weitzman, E.D.; Fukushina, D; Nogueire, C; Roffwarg, H.; et al.  
Twenty four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in nor--  
mal subjects.  
J. Clin Edocr. 33: 14 ( 1971 )
- 16.- Sayers, G; y Sayers, M.A.  
Regulation of pituitary adrenocorticotrophic activity during the respon--  
se of the rat to acute stress.  
Endocr. 40: 265 ( 1947 )

- 17.- Hodges, J.R.; y Jones, M.T.  
The effect of injected corticosterone on the release of ACTH in rats -  
exposed to acute stress.  
J. Physiol. 167: 30 ( 1963 )
- 18.- Ganong, W.F.  
The Central nervous system and the synthesis and release of adrenocort  
trotrophic hormone.  
Advances in Neuroendocrinology p. 92 ( 1963 )
- 19.- Besser, G.M; y Edwards, C.R.W.  
Cushing's Syndrome  
Clinics Endocr. and Metab. 1: 451 ( 1972 )
- 20.- Hamilton, W.  
Congenital adrenal hyperplasia  
Clinic Endocr. and Metabolism 1: 503 ( 1972 )
- 21.- Editorial: Identifying the adrenal lesion in primary aldosteronism.  
Annals of Internal Medicine Vol. 76; No. 6; p- 1039 ( 1972 )
- 22.- Horton, M.D. Rechard y Finck, M.D. Ethyl  
Diagnosis and localization in primary aldosteronism.  
Annals of Internal Medicine 76: 885 ( 1972 )
- 23.- Brooks, R.V. et al  
Hyperaldosteronism from adrenal carcinoma  
Br. Med. J. i; 220 ( 1972 )
- 24.- Irvine, W.J.; Barnes, E.W.  
Adrenocortical Insufficiency  
Clinics Endocr. Metab. 1: 549 ( 1972 )
- 25.- Editorial: Hidden Adrenocortical Insufficiency  
Br. Med. J. 4: 5 ( Oct. 1973 )
- 26.- Besser, G.M.  
Physiology of adrenal cortical function  
Br. Med. J. 1: 310 ( 1972 )

- 27.- Dunlop, D.M.  
86 cases of Addison's disease  
Brit. Med. J. ii; 887 ( 1963 )
- 28.- Besser, G.M. et al.  
Immunoreactive corticotrophin levels in adrenocortical insufficiency  
Br. Med. J. i; 374 ( 1971 )
- 29.- C.H. Li  
Proposed system of terminology for preparations of adrenocorticotrophic hormone.  
Science 129: 969 ( 1959 )
- 30.- Mecanismo de acción de la hormona adrenocorticotrópica.  
Gaceta Médica Mexicana. 102: 369 ( Oct. 1971 )
- 31.- Rosenblum, A.H.; y Rosenblum P.  
Anaphylactic reactions to adrenocorticotrophic hormona in children.  
J. Pediat. 64: 387 ( 1964 )
- 32.- Wilson, L.A.  
Protein shock from intravenous ACTH  
Lancet ii: 478 ( 1951 )
- 33.- Hill, B.H.; y Swinburg, P.D.  
Death from corticotrophin  
Lancet L: 1218 ( 1954 )
- 34.- El-Shaboury; A.H.  
Assesment of long-acting syntethic, corticotrophin in hypersensitive -  
asthmatics and normal subjects.  
Brit. Med. J. 653 ( 1968 )
- 35.- Landon, J; James, V.H.T.; Cryer, R.J. et al.  
Adrenocorticotrophic effects of a synthetic polypeptide B<sup>1-24</sup> cortico-  
trophin in man.  
J. Clin. Endocr. Metab. 24: 1206 ( 1964 )

- 36.- Kehlet, H. et al  
Short ACTH test in assessing hypothalamic-pituitary adrenocortical function.  
Br. Med. J. i ( 6004 ): 249 ( Jan. 1976 )
- 37.- Galvao Teles A; Burke, C.W. y Fraser, R.T.  
Adrenal function tested with tetracosactrin depot.  
Lancet 1: 557 ( 1971 )
- 38.- Besser, G.M.; Buttler, P.W.P.; y Plumpton, F.S.  
Adrenocorticotrophic action of long-acting tetracosactrin compared with corticotrophin gel.  
Brit. Med. J. 4: 391 ( 1967 )
- 39.- Porter, C.C.; y Silber, R.H.  
A quantitative color reaction for cortisone and related 17,21-dihydrox-20 ketosteroids.  
J. Biol. Chem. 185: 201 ( 1950 )
- 40.- Mattingly, D.  
A simple fluorometric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human plasma.  
J. Clin. Path. 15: 374 ( 1962 )
- 41.- Luis E. Mejer y Roberta C. Blanchard  
Fluorometric determination of plasma 11-hydroxycorticosteroids  
II Studies on the specificity of the method  
Clin. Chem. Vol. 19; No. 718 ( 1973 )
- 42.- DeMoore, P; Osinski, P; Decky, R; y Steeno, D.  
The specificity of fluorometric corticoid determinations  
Clin. Chem. Acta 7: 475 ( 1962 )
- 43.- Medical Research Council working party report.  
Recommended method for the determination of plasma corticosteroids.  
Br. Med J. 2: 310 ( 1971 )

Esta Tesis se imprimió en Noviembre de 1977  
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,  
en los Talleres de Impresos Offisali-G, S. A., Av.  
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),  
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F