

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio del cortisol basal y bajo diferentes estímulos
farmacológicos como medida de la función suprarrenal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Torres Huertas

DIRECTOR:

Alberto Oriol Bosch

Madrid, 2015

R. 22 25

BIBLIOTECA UCM



5309478692

DE° 612,45
TOR

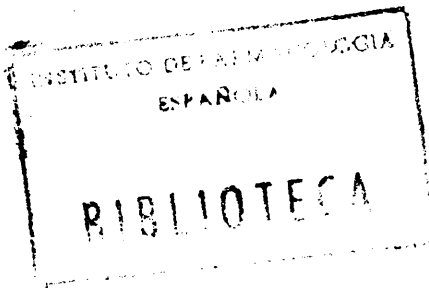
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TA 1764

FACULTAD DE MEDICINA

"ESTUDIO DEL CORTISOL BASAL Y BAJO DIFERENTES ESTIMULOS
FARMACOLOGICOS COMO MEDIDA DE LA FUNCION SUPRARRENAL"

por Jose Torres Huertas



Tesis presentada para aspirar al
grado de Doctor en Medicina y Cirugia.

Director: Prof. A. ORIOL BOSCH

CATEDRA DE ENDOCRINOLOGIA EXPERIMENTAL

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA



Biblioteca
de Medicina

A mi mujer y a mis tres hijos.

A G R A D E C I M I E N T O S

En primer lugar al Prof. D. Alberto Oriol Bosch, director de esta Tesis Doctoral, por su constante enseñanza, ayuda y permanente estímulo.

Al Dr. Esteban Mancheño, al que debo mi introducción en los métodos de análisis por saturación y no pocas enseñanzas sobre muchos puntos, de los que constituyen este trabajo.

A los Drs. Javier Bagazgoitia y Francisco Duran, del Laboratorio de Hormonas del Hospital Clínico, cuya colaboración en la obtención de datos ha sido muy valiosa.

Al Dr. Francisco Cano Iglesias, Jefe del Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico, quien me inició en el estudio clínico de los problemas endocrinológicos.

A todos mis compañeros del Departamento de Fisiología (Cátedra I de Fisiología y Cátedra de Endocrinología Experimental) y en especial al Prof. Gallego Fernandez, creador de uno de los núcleos de estudio e investigación más importantes del país, sin el cual no hubiera sido posible este trabajo.

Un recuerdo muy cariñoso para Juan Miguel y M. Jesus, quien con su estímulo en épocas preteritas, pero no olvidadas, facilitaron la culminación de esta etapa.

I N D I C E

<u>CAPITULO</u>	<u>I.- INTRODUCCIÓN</u>	<u>Página</u>
	I.1.- Revisión histórica	1
	I.2.- Métodos plasmáticos	5
	I.2.1.- Fluorescencia	5
	I.2.2.- Métodos de desplazamiento competitivo	14
	I.3.- Métodos urinarios	17
	I.3.1.- 17-cetoesteroides	17
	I.3.2.- Esteroides 17-cetogenicos . .	20
	I.3.3.- Cortisol libre urinario . . .	26
	I.4.- Pruebas rápidas de función adrenal. .	30
	I.4.1.- Prueba de estimulación en 1-24 corticotrofina	31
	I.4.2.- Estudio del ritmo espontaneo de secreccion	36
	I.4.3.- Supresión del eje hipotálamo- hipofisis-suprarrenal	42
<u>CAPITULO</u>	<u>II.- OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</u>	45
<u>CAPITULO</u>	<u>III.- MATERIAL Y METODOS</u>	
	III.1.- Estudios sobre la valoración clínica de la cinética de la respuesta de un octadecapeptido de síntesis	47
	III.1.1.- Sujetos experimentales . .	47
	III.1.2.- Diseño experimental. . .	47

	<u>Página</u>
III.1.3.- Métodos de laboratorio . . .	47
1) Método de Matingly . . .	48
2) Método de Apleby	51
III.2.- Analisis de los valores de cortisol plasmático (11-OH-CS) en una pobla ción "control" hospitalaria.	57
III.2.1.- Diseño experimental	57
III.2.2.- Métodos de laboratorio . . .	57
III.3.- Cuantificación de cortisol libre urinario	58
III.3.1.- Reactivos	58
III.3.2.- Soluciones.	58
III.3.3.- Proceso de analisis	59
III.4.- Métodos estadísticos	64
III.4.1.- Estadística paramétrica. .	64
III.4.2.- Estadística no paramétrica.	68

CAPITULO IV .- RESULTADOS

IV.1.- Estudios sobre la valoración clínica de la cinética de la respuesta a un octadecapeptido de síntesis	82
IV.1.1.- Niveles basales de la pobla ción experimental utilizada	82
IV.1.2.- Respuesta máxima al β^{1-24} - -ACTH	82
IV.1.3.- Respuesta comparativa entre β^{1-24} -ACTH y D-Ser ¹ -Lys ¹⁷⁻¹⁸ - - β^{1-18} -ACTH	83
IV.1.4.- Efecto de las vias de adminis tración del D-Ser ¹ -Lys ¹⁷⁻¹⁸ - - β^{1-18} -ACTH sobre la cinética del cortisol plasmático	84

	<u>Página</u>
IV.1.5.- Efecto de dosis decrecientes del D-Ser ¹ -Lys ¹⁷⁻¹⁸ - β ¹⁻¹⁸ -ACTH sobre la cinética del cortisol plasmático	85
IV.1.6.- Medida de las respuestas <u>adrenales</u> por la excrección <u>urinaria</u> de los 17 KS y 17-OH-CS	85
IV.1.7.- Correlación entre valores basales de 11-OH-CS plasmáticos y de 17-OH-CS (totales) <u>urinarios</u>	86
IV.1.8.- Correlación entre la secreción adrenal y los 17-OH-CS (totales) <u>urinarios</u>	87
IV.2.- Analisis de los valores de 11-OH-CS plasmáticos en una población "control" ambulatoria hospitalaria	118
IV.2.1.- Basales y distribución por sexos y edades	118
IV.2.2.- Estimulación con el β ¹⁻²⁴ -ACTH	118
IV.2.3.- Estudio del ritmo espontáneo de secreción	120
IV.2.4.- Inhibición con Dexametasona	121
IV.3.- Cortisol libre en orina	
IV.3.1.- Variación del método por C.P.B.	128
IV.3.2.- Basales y post-estimulación con β ¹⁻²⁴ -ACTH, en individuos normales obtenido con el método por C.P.B.	130
IV.3.3.- Estudio de cinco casos de hipercorticalismo	130

CAPITULO V.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

V.1.- Estudio sobre la valoración clínica de la cinética de la respuesta a un octadecapeptido de síntesis	140
V.1.1.- Niveles basales de la población experimental utilizada	140
V.1.2.- Respuesta máxima al β^{1-24} -ACTH	140
V.1.3.- Respuesta comparada entre β^{1-24} -ACTH y D-Ser ¹ -Lys ¹⁷⁻¹⁸ - β^{1-18} -ACTH	141
V.1.4.- Efecto de la vía de administración del polipeptido D-Ser ¹ -Lys ¹⁷⁻¹⁸ - β^{1-18} -ACTH	142
V.1.5.- Efecto de dosis decrecientes del polipeptido D-Ser ¹ -Lys ¹⁷⁻¹⁸ - β^{1-18} -ACTH	143
V.1.6.- Medida de la respuesta adrenal por la excreción urinaria de 17-KS y T-17-OH-CS	143
V.1.7.- Correlación entre valores basales de 11-OH-CS plasmáticos y 17-OH-CS urinarios	144
V.1.8.- Correlación entre secreción adrenal y 17-OH-CS urinarios	144
V.2.- Análisis de los valores de 11-OH-CS plasmáticos en una población "control" hospitalaria	145
V.2.1.- Basales y distribución por sexos y edades	145
V.2.2.- Estimulación con el β^{1-24} -ACTH	146
V.2.3.- Estudio del ritmo espontáneo de secreción	147
V.2.4.- Inhibición con Dexametasona	148
V.3.- Cortisol libre urinario.	149

	<u>Página</u>
V.3.1.- Discusión del método analítico por C.P.B. de cortisol en plas ma y orina	149
V.3.2.- Discusión de los resultados ob tenidos con este método	153
 <u>CAPITULO VI.- CONCLUSIONES</u>	 156
 <u>BIBLIOGRAFIA</u>	 160

I. INTRODUCCION

I.1.- Revisión histórica

Las glandulas suprarrenales eran conocidas en la antigua literatura como cuerpos suprarrenales o capsulas suprarrenales. Parece ser que fue BARTOLOMEO EUSTACCHIO el primero en descubrirlas en 1563, denominandolas Glandulae Renibus Incumbentes. Sus Tabulae Anatomicae no fueron publicadas hasta el año 1714 por el clínico italiano LANCISI.

Ningun estudio funcional fue publicado durante trescientos años hasta que THOMAS ADDISON, (1855), describe concisa y elegantemente, once casos fatales que él y sus colegas del Hospital GUY, han observado durante los años precedentes, describiendo la enfermedad que lleva su nombre como "The leading and characteristic features of the morbid state to which I would direct attention are, anaemia, general langour and debility, remarkable feebleness of the heart's action irritability of the stomach, and a peculiar change of colour in the skin, occurring in connection with a diseased condition of the "supra-renal capsules".

Las correctas deducciones de Addison no fueron aceptadas plenamente por sus contemporaneos. Hay solo una pequeña correlacion entre el síndrome de Addison crónico y el fallecimiento en poco tiempo de los animales que han sufrido una adrenalectomia total. La pigmentación descrita en la enfermedad de Addison no puede ser reproducida experimentalmente.

Al año siguiente BROWN-SEQUARD (1856) demuestra experimentalmente que estas glandulas son imprescindibles para la vida, su extirpación en conejos, perros, gatos y monos, desencadena rapidamente la muerte, en un tiempo variable entre algunas horas y dos días como

máximo.

La extracción de un principio activo del tejido suprarrenal no fue posible hasta finales de los años 1920, ensayando sobre animales adrenalectomizados y estudiando su supervivencia. HARTMAN y Col. (1927) preparan un extracto que alarga la vida de estos animales, pero no por un periodo de tiempo indefinido. ROGOFF y STEWART (1928), probablemente llegaron a la misma conclusión, aunque reconocieron que su preparación era menos efectiva que la solución Ringer. Entre 1929 y 1930 SWINGLE y PFIFNER (1930, 1931) por un lado y HARTMAN y Col. (1930) por otro, obtienen un extracto liposoluble de tejido suprarrenal, de potencia relativamente alta. Ambos grupos demostraron que sus preparaciones mantenían indefinidamente con vida gatos adrenalectomizados, y que jóvenes ratas adrenalectomizadas y tratadas con estos extractos, llegaban a la madurez y eran capaces de fecundar. La primera demostración clínica humana, de la utilidad del extracto adrenal de SWINGLE y PFIFNER fue realizada por los Drs. LEONARD ROUNTRE y C. H. GREENE (1930) de la Clínica Mayo, en un enfermo de coma Addisoniano, en el que obtuvieron una drámatica remisión.

La clave del posterior progreso fisiológico, se encontró mediada la década de los 30, con el aislamiento e identificación de numerosos esteroides, principios activos del extracto suprarrenal. STEIGER y REICHSTEIN (1937) identificaron la 11-desoxi-corticosterona en cantidades muy pequeñas formando parte del extracto adrenal y establecieron la naturaleza esteroidea de los corticosteroides. PFIFNER (1942) y sobre todo KENDALL (1937, 1949) identificaron la mayoría

de los esteroides adrenales. Poco a poco fueron sintetizados los esteroides principales. SARRET (1946) y Col. en los laboratorios de la MERCK sintetizó la cortisona y mas posteriormente a partir de unos trabajos de SIMPSON y TAIT (1955) se logró sintetizar la aldosterona.

Las distintas acciones fisiologicas de los glucocorticoides, son sospechados desde primeros del presente siglo. CORI (1927) evidencia que el azucar en sangre y el glucogeno almacenado, tienen niveles bajos (aunque no todas las veces) en la hipofunción suprarrenal. SIDNEY BRITTON (1932) expone que la función preponderante de la corteza adrenal es la influencia sobre el metabolismo de los carbohidratos. FRY y Col. (1940) establece de una forma convincente, que algún producto secretado por la adrenal es esencial para la normal neoglucogenesis a partir de las proteínas y otros aspectos homeostáticos del metabolismo.

La interconexión entre las gonadas y la suprarrenal que sospechada por WOOLLEY (1902) y VULLOCH y SEQUEIRA (1905) con ocasión de la observación de distintos sindromes adrenogenitales, aunque los modelos experimentales ensayados en animales no dieron resultado. PARKINS y GAUNT (1933) administraron extractos de corteza adrenal a ratas inmaduras en un esfuerzo para modificar su desarrollo sexual, sin conseguirlo.

INGLE y KENDALL (1937) demuestran la existencia de un sistema "Feedback" por el que la estimulación hipofisaria de la adrenal, va seguido de un efecto inhibitorio de las hormonas adrenales sobre la hipofisis, dejando claro que este sistema "Feedback" no debe ser el

único implicado en la regulación del mecanismo de secreción adrenal.

A partir de 1930, fue haciéndose cada vez mas evidente, que los animales con deficiencia adrenal eran muy susceptibles a cualquier noxa (tóxicos, traumas, drogas, ejercicio extremo, infecciones, etc.) SELYE (1946) resume ejemplarmente toda la información acumulada hasta entonces y establece el papel preponderante de un buen funcionamiento adrenal en los fenomenos de adaptación.

PHILIP HENCH (1949), en la Clínica Mayo, habia observado durante cierto tiempo, que las enfermas de Artritis Reumatoide mejoraban de su padecimiento durante el embarazo, lo que atribuyo a alguna substancia natural presente en abundancia durante este estado, poco a poco y en colaboración con E. C. KENDALL, fue sospechando que esta substancia antirreumatica no era otra cosa que una hormona. HENCH, KENDALL, SLOCUMB y POLLEY (1949). acordaron utilizar cortisona y ACTH en 14 enfermos de Artritis reumatoide. El resultado fue un descubrimiento de primera magnitud en la terapeutica médica.

Un capitulo posterior ha sido el desarrollo de moléculas sintéticas de esteroides (prednisolona, dexametosona, etc,) de mayor potencia y especificidad que las hormonas naturales.

En la actualidad las distintas acciones fisiologicas y farmacológicas de los glucocorticoides nos son bien conocidas. Su uso farmacologico cada vez mas extendido, especialmente en afecciones crónicas como, artritis reumatoides, lupus eritematoso, poliarteritis nodosa, dermatomiositis, arteritis de celulas gigantes, asma bronquial, bronquitis crónica, sarcoidosis, tuberculosis pulmonar, síndrome nefrotico, glomerulonefritis membranosa, leucemia, oftalmopa-

tias, etc., hacen cada vez mas frecuentes la aparición de Cushing y atrofas suprarrenales iatrogenicas, siendo por lo tanto imprescindibles las dosificaciones control de glucocorticoides en plasma y orina en el seguimiento de estos enfermos crónicos.

Vamos pues a revisar los distintos métodos utilizados para la dosificación de glucocorticoides en plasma y orina, con especial referencia a los métodos empleados en las determinaciones de las muestras obtenidas en los protocolos que constituyen el contenido de esta tesis doctoral.

I.2.- Métodos plásmaticos

Aunque exista la posibilidad de cuantificar el cortisol plasmático por colorimetría (17-OH-CS), no fue hasta la introducción de los procedimientos fluorimetricos, que se logro simplificar el proceso analítico de forma tal que se pudiera extender su utilización mas alla de unos pocos centros, dedicados principalmente a la investigación.

I.2.1.- Fluorescencia

El cortisol junto con la cortisona tienen la propiedad de desarrollar una intensa fluorescencia, cuando se exponen a la acción de la luz ultravioleta, en solución de ácido sulfurico concentrado. Esta reacción tiene la ventaja de su simplicidad, sensibilidad y relativa especificidad. Reaccionan los Δ^4 -3 cetoesteriodes, que poseen un grupo hidroxilo en el carbono 11, y es lo suficientemente sensible como para detectar fracciones del orden de microgramos, en una solución pura, sin gran dificultad. El mayor problema para la aplica-

ción del método a pequeños volúmenes de plasma, reside en la aparición de sustancias fluorescentes, no específicas.

Los primeros en aplicar la fluorescencia con ácido sulfúrico, para la determinación de cortisol en plasma fueron SWEAT y FARRELL (1952). Con este método SWEAT (1955), encontró en sangre humana periférica una concentración media de $10,8 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$ de cortisol y alrededor de $4 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$. de corticosterona.

BLISS y Col. (1953) compararon el método de Nelson y Samuel (Colorimetría) con el de SWEAT y FARRELL, en una serie de 10 muestras de plasma en sujetos estimulados con corticotrofina. La media obtenida por el primer método fue de $22,5 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$. y por el segundo de $23,1 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$. con muy poca dispersión en los datos individuales. Estos dos métodos dependen de dos reacciones químicas distintas y solo los esteroides adrenales, cortisol, epicortisol, corticosterona, epicorticosterona y Δ^4 pregneno $11\beta-17\alpha, 20\beta-21$ tetraol-3ona, reaccionan en ambos casos.

SILBER y Col. (1958), encontraron que el plasma de rata contiene gran cantidad de corticosterona, pudiéndose eliminar la cromatografía previa con sílica gel y realizar la reacción a partir del extracto de plasma. GUILLEMIN y Col. (1959) confirmaron un año después este hallazgo, lo mismo que ZENKER y BERNSTEIN (1958).

La corticosterona da una fluorescencia en ácido sulfúrico más intensa que el cortisol y el método simplificado

(sin cromatografía previa) que es útil para el plasma de rata, debe ser también investigado con el plasma humano. DE MOOR y Col. (1960) aplican el método simplificado al plasma humano. Estos autores extraen el plasma primero con éter-petroleo para disolver las sustancias grasas y a continuación con 3-5 volúmenes de cloruro de metileno, extraen el esteroide. El extracto es lavado brevemente con NaOH, 0,1 N y se le agrega una mezcla de etanol-acido sulfúrico. El material de fluorescencia dentro de la fase de ácido sulfúrico y cloruro de metileno se aspira. La fluorescencia en fase ácida es entonces medida como una verdadera fluorometría.

De esta forma se descubrió un método rápido para la determinación del cortisol plasmático, con una recuperación sobre el cortisol puro añadido del 96 al 107 %. Pero los niveles medios de 11-hidroxicorticoides encontrados en sujetos no estresados, son considerablemente mayores que los obtenidos por el método de Porter-Silber y también más altos que los encontrados por SWEAT por fluorescencia.

Mucho se ha discutido sobre la realidad de los corticosteroides plasmáticos, determinados en los métodos fluorimétricos, confundiendo eficacia con precisión. Una cosa es un método de análisis clínico, útil para determinar las alteraciones de la glándula suprarrenal, reflejadas por el cambio de las concentraciones plasmáticas de los esteroides hormonales adrenales y otra cosa es disponer de un método sencillo

para determinar exclusiva y específicamente cortisol y corticosterona.

El método como originalmente fue introducido por DE MOOR y Col. fue descrito para medir los 11-hidroxicorticoides libres en plasma, que son además del cortisol y la corticosterona, el 20- β -hidroxicortisol, con actividad igualmente fluorogena como DE MOOR había preconizado. La reacción de fluorescencia esta dada por los Δ^4 -3 ceto-11 hidroxicorticoides y por lo tanto cortisona, tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisona y tetrahydro - S todos dan fluorescencia, aunque despreciable, en la reacción. Los análogos sintéticos tales como prednisona y prednisolona dan una cierta fluorescencia, pero además como las dosis terapéuticas utilizadas con estos esteroides son relativamente altas, existe pues alguna interferencia cuando se determinan los 11-OH-CS en plasma en pacientes tratados con prednisona. Con triamcinolona el riesgo de interferencia es menor, porque las dosis utilizadas son menores y da menor fluorescencia. Con Dexametasona o Betametasona el riesgo de interferencia es despreciable pues se utilizan dosis muy pequeñas de ellos. Los cuerpos cetónicos que tanto interfieren la reacción de Porter y Silber no afectan a los métodos fluorimétricos.

El método original propuesto por DE MOOR y Col. ha sufrido varias modificaciones de las cuales la más importante ha sido la sugerida por MATTINGLY (1962), que apuntó que para propósitos clínicos, no era necesario el lavado con

NaOH 0,1N ó el lavado con eter-petroleo del extracto. Este método determina los productos adrenales hormonales en forma de 11-hidroxicorticoides, no es por lo tanto un método específico para determinar el cortisol y no está justificado cuando se utiliza, referirse a los valores de cortisol plasmático, Es , dada su rapidez y sencillez, un método ideal de "Screening".

Quizás la mayor desventaja del método de MATTINGLY, es la no eliminación de la fluorescencia inespecífica de fondo. Es relativamente importante en el caso de concentraciones medias o altas de 11-OH-CS plasmáticas, pero por el contrario es una gran fuente de error en el caso de concentraciones muy bajas. La magnitud de este fondo de fluorescencia inespecífica es del orden de 2 a 4 $\mu\text{gr}/100$ ml. Cuando en sujetos sospechosos de hipofunción adrenal, no se encuentren concentraciones de 11-OH-CS muy bajas, debe buscarse una posible fuente de error, en las impurezas de los reactivos utilizados, o en las superficies de los recipientes de vidrio empleados. MATTINGLY, observó que el eter-petroleo usado normalmente para lavar los extractos era responsable de una gran magnitud de fluorescencia inespecífica, cuando se omite este lavado, el valor medio de los 11-OH-CS obtenido en pacientes suprimidos con dexametasona es del orden del 2 -6 $\mu\text{gr}/100$ ml. frente a los 4 - 9 $\mu\text{gr}/100$ ml. que encontraba DE MOOR.

No hay duda de la existencia de sustancias en el plasma

ma que se conservan en el extracto y dan una fluorescencia inespecífica. Cuando la corteza adrenal está totalmente suprimida por una terapeutica a altas dosis y mantenida durante cierto tiempo, no es raro encontrar en el plasma de estos pacientes, valores de los 11-OH-CS distintos de cero. Estas sustancias deben ser pues, no esteroideas. La verdadera naturaleza de estas sustancias, responsables de la fluorescencia inespecífica no está determinada totalmente, habiendose dedicado al tema mucho tiempo y esfuerzo.

Comparando las conclusiones obtenidas por distintos grupos de trabajo, con respecto a este problema de la fluorescencia inespecífica STAHL y DORNER (1966), sugieren que una parte de esta fluorescencia inespecífica se desarrolla muy rapidamente, en los primeros dos o tres minutos y que la segunda parte de esta, aparece progresivamente en el trascurso de varias horas. Entre estas dos fases en el tiempo, aparece la fluorescencia debida a los verdaderos 11-hidroxycorticosteroides, que son en su mayor parte cortisol y corticosterona. Este desarrollo de fluorescencia específica y valorable, tiene un "plateau" máximo entre los 8 y 20 minutos, es por lo tanto en este intervalo de tiempo cuando debe realizarse la lectura.

JAMES y Col. (1967) reducen la fluorescencia inespecífica por extracción del plasma a un pH alcalino, obteniendo rapidamente la verdadera fluorescencia, usando acido muy concentrado en los reactivos, por éste método la lectura

ha de realizarse solo 3 minutos como máximo, después de la mezcla, lo que hace muy apto su empleo para autoanálizadores. Usando este método automatizado se han obtenido muy buenas correlaciones, con los métodos isotópicos de determinación del cortisol (TOWNSEND y JAMES, 1968). Pero a esta afirmación hay que objetar, que también PETERSON y Col. (1953), obtenían muy buena correlación entre los 17-OH-CS determinados por colorimetría y el cortisol medido isotópicamente, sin que este hecho mejorase los inconvenientes de la utilización de la reacción colorimétrica.

Cuando los niveles corticosteroides plasmáticos son bajos JAMES y Col. (1967), encuentran con la técnica de MATTINGLY alrededor de un 50 % más del cortisol verdadero contenido en la muestra. Esta proporción no es constante, dependiendo del grado de actividad adrenal y va disminuyendo cuando la actividad de la glándula se aproxima a valores normales.

Por el método rápido automatizado introducido por TOWNSEND y JAMES, se obtienen valores del orden de 1 - 4 μ gr/100 ml. por encima del cortisol verdadero medido por el método isotópico, este exceso en su mayor parte corresponde a la corticosterona. El método puede detectar hasta valores de 1 μ gr/100 ml. y después de la adrenalectomía o supresión con dexametasona se obtienen valores de 1 μ gr/100 ml. aproximadamente.

El método fluorimétrico fue al principio aplicado a extractos cuidadosamente purificados, en los que la fracción de cortisol fue separada de la corticosterona y de impurezas. SWEAT (1955) encontró concentraciones medias de cortisol en plasma humano de $10,8 \mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$, que coinciden satisfactoriamente con los valores de cortisol que se encuentran por métodos isotópicos. Pero los valores medios de corticosterona que SWEAT encontró, eran sensiblemente mas altos que los hay admitidos que oscilan alrededor de $1-2 \mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$

Las estimaciones de los 11-OH-CS totales en plasma dan una media que depende, de alguna forma, de los detalles del método, MATTINGLY encuentra una media de $15 \mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$ usando practicamente el mismo método. Estos valores son del orden de un 50 % mayores que los valores de cortisol verdadero, TOWNSEND y JAMES (1968) dan por el método automatizado valores de los 11-OH-CS plasmáticos del orden de $11,2 \mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$

Cualquier método basado en una medida final de la fluorescencia es vulnerable a interferencias con un gran número de sustancias orgánicas. Este hecho esta plenamente aceptado en los métodos fluorimétricos de determinación de los 11-OH-CS. Algunas de las fuentes de interferencia todavía son desconocidas.

Algunas de las sustancias en las que se ha estudiado esta interferencia, son las siguientes:

- Bilirrubina: Es una causa apreciable de fluorescencia inespecífica, tanto mas importante cuanto menor sea la concentración de 11-OH-CS plasmáticos, interfiere tanto en forma libre como conjugada y es muy manifiesta si su concentración se acerca a los 4 mgr/100 ml. El lavado de extracto de cloruro de metileno con hidroxido sódico 0,1 N. elimina esta interferencia (DENNIS, 1963).
- Triparanol: produce una fluorescencia inespecífica muy marcada (MATTINGLY, 1962). Es muy raramente usado en la actualidad.
- Carotenos y tetraciclínas: dan un intenso color amarillo pero no interfieren en la fluorescencia (DENNIS, 1963).
- La hipercolesterolemia no es causa de interferencia (MATTINGLY, 1962).
- Los antibioticos como penicilina, estreptomicina y cloro micetina no dan interferencia (DENNIS, 1963).
- Espirolactona: SEIDENSTICKER y Col. (1967) han demostrado que la aldactona produce una fluorescencia de la misma longitud de onda que el cortisol y las lecturas altas en plasma permanecen elevadas hasta 10 días despues de haber ingerido la droga. LURIE (1970), ha confirmado esta interferencia y señala que después de 48 horas con espirolactona, un plasma de un rango normal de 11-OH-CS de 11 a 22 μ gr/100 ml. tomaba unos valores de 46 a 144 μ gr/100 ml. mientras que la reacción urinaria de 17-cetosteroides y 17-cetoge-nicos permanecía inalterada.

- Heparina: WERK y Col. (1967) encuentran que las disoluciones de heparina causan una seria interferencia. La causa reside, al parecer, en las trazas de alcohol benzilico que se utilizan para conservar la solución, el error puede llegar a ser del orden de 10 μ gr/100 ml. Pero KENDALL y Col. (1968) encuentran que esta interferencia ocurre solo cuando el cloruro de metileno contiene impurezas, de aquí se deduce, la necesidad de purificar este reactivo cuando se aplica la tecnica de Mattingly.

- Cetosis: KRUGER y Col. (1965) encuentran que al contrario de lo que sucede con el método de Porter-Silber, el aumento de cuerpos cetónicos, no interfiere en la determinación de los 11-OH-CS por fluorimetría.

- Fenotiazinas: No son causa de interferencia (SEIDENSTICKER y Col. 1967).

- Barbitúricos: No son causa de interferencia (DENNIS, 1963).

- Digital y Quimidina: No son causa de interferencia (DENNIS, 1963)

I.2.2.- Metodos de desplazamiento competitivo

Los métodos de desplazamiento competitivo C.P.B. o R.I.A. se basan en la competencia de dos sustancias identicas, una marcada y otra no, o una exogena y otra endogena, para unirse a un mismo substrato, una proteina en C.P.B. o un anticuerpo específico en R.I.A.

El primer método para la determinación de cortisol plasmático por C.P.B. fue desarrollado por MURPHY y PATTE (1964).

La extracción del plasma se realiza con un volumen doble de etanol y la reparación de las dos fases por centrifugación. Un volumen conocido de este extracto se evapora a sequedad y al residuo se le agrega una solución de plasma de mujer embarazada, diluido al 2,5 % en agua, que se utiliza como fuente de globulina. Una pequeña cantidad de cortisol o corticosterona tritiada se agrega también al sistema. Después de calentar ligeramente la mezcla se verifica la competición entre el cortisol tritiado, agregado y el cortisol endogeno presente en el extracto, por el limitado número de lugares de unión con la transcortina presente en el sistema. Conseguido el equilibrio, la relación entre el cortisol tritiado libre y unido, nos determina la cantidad de cortisol endógeno al referirlo a una curva "standard" construida previamente con cantidades de cortisol no marcado conocidas.

Se han usado varios métodos para separar la fracción libre de la fracción ligada. El método original empleaba una dialisis a través de "Cellopane", pero posteriormente fue reemplazado por una filtración a través de columna de "Sephadex" (MURPHY y PATTE, 1964) y mas recientemente el mismo autor recomienda agregar "Florisil" a la mezcla (MURPHY, 1967).

Este método determina cantidades de 0,03 μ gr de cortisol o menos y puede ser estimado el cortisol en menos de 1 ml. de plasma. Es un método reproducible y de valores comparable con otros y da como valor medio en personas norma

les de cortisol plasmático $16 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$. NUGENT y MAYES (1966) han demostrado que los resultados obtenidos por el, se correlacionan bastante bien con métodos mas específicos que incluyen cromatografía en capa fina y un control isotópico interno. La recuperación que se obtiene es del orden del 94 %. IZURZAETA y Col. (1970) han probado sus resultados con los más sofisticados de doble dilución isotópica. FRASER y JAMES (1968), encontró un coeficiente de correlación entre ambos de $r = 0,95$ y las medidas difieren con ambos metodos en solo $2,24 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$. como máximo, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa. No obstante, se encuentran grandes diferencias en circunstancias en que existe una concentración anormalmente grande de esteroides en plasma, como por ejemplo, en plasma de cordón umbilical, en el recién nacido, y en sujetos con hiperplasia adrenal congénita. Estas discrepancias pueden ser eliminadas mediante una cromatografía preliminar tal como recomiendan BEITLINS y Col. (1970). Pero la introducción de esta etapa previa aumenta la complejidad del método y reduce sus posibilidades de aplicación clínica.

El método determina fundamentalmente, cortisol, 11-desoxicortisol y corticosterona que compiten por los mismos lugares de unión. Una inicial purificación y reparación pueden hacerlo completamente específico.

Para la determinación del cortisol por C.P.B. han sido utilizados distintas fuentes de macromoléculas capa

ces de unir la molecula del esteroide. En su descripción original MURPHY utiliza como fuente de transcortina plasma humano y posteriormente plasma de varias especies animales, con el fin de conseguir una tecnica mas especifica (MURPHY 1967). Otros autores han utilizado plasma de embarazada (POKOLY, 1973) de mujeres tratadas con anovulatorios (LIPSETT, 1970) de pacientes sometidas a tratamiento crónico con estrógenos (BROWN, 1971) etc.

En esta tesis presentamos un método convencional por C.P.B. para medida de corticosteroides en plasma y orina, que utiliza como fuente de C.B.G., plasma de mujer ovariectomizada tratada cronicamente con estrógenos y dexametasona.

I.3.- Métodos Urinarios

Fueron los primeros utilizados para valorar analiticamente la función suprarrenal. Describimos los métodos que determinan los 17-cetoesteroides (17-KS) y los esteroides 17-cetogenicos (17-KGS).

1.3.1. 17-cetoesteroides (17-KS):

Forman un gran grupo de compuestos esteroides que tienen en común, como su nombre indica, un grupo cetona en el carbono 17. Pese a su denominación son hormonalmente inactivos, salvo la androsterona y la dehidroepiandrosterona que tienen una cierta actividad andrógenica. En general representan la última etapa en la degradación metabólica de una gran variedad de esteroides con actividad hormonal y que sintetizan en el testiculo o en la corteza adrenal.

Este grupo es bien conocido en la clínica gracias a una reacción química relativamente simple desarrollada por CALLOW y Col. (1938), para su determinación. El método está basado en la reacción colorimétrica de ZIMMERMAN (1935), con el m. dinitrobenceno y una solución alcohólica de hidróxido potásico. Se ha utilizado y se utiliza como un test de función adrenal y se ha observado desde hace bastante tiempo que individuos con un hipoadrenalismo daban valores muy bajos de 17-KS en orina, mientras que individuos con carcinoma adrenal daban valores muy altos. Mientras no se dispuso de otro método fue el único medio de evaluar la actividad adrenal.

Este método ha sido cada vez más desplazado, por otros más sensibles y específicos. Sin embargo utilizando una cromatografía previa, es un método de gran valor, sobre todo para valorar ciertos defectos enzimáticos, como los que se dan en las distintas variedades de la hiperplasia adrenal congénita.

Los 17-cetoesteroides, lo mismo que otros compuestos presentes en la orina en pequeñas cantidades son relativamente insolubles en agua. Para hacerlos solubles en ésta y poder ser eliminados por el riñón, son conjugados en el hígado con ion sulfato o ácido glucurónico. Probablemente todos los cetoesteroides neutros son excretados por la orina en esta forma, volviéndose insolubles en disolventes lípidos ordinarios. La androsterona ha sido aislada de ambas formas (VENNING y Col., 1942). La dehidroepiandrosterona ha sido aislada como

sulfato (MUNSON y Col., 1944) y otros muchos incluyendo la etiocholanolona en forma de glucuronidato (WEST y Col., 1951).

Pese a que todos los 17-cetoesteroides dan un color con los reactivos en la reacción de ZIMMERMAN, la intensidad de este color difiere con los distintos esteroides individuales. La relativa intensidad cromógena viene dada en la tabla 1 que ha sido tomada de WILSON (1954) y SOBEL y Col. (1958).

T A B L A 1

Esteroides	Color relativo por mol	
	WILSON	SOBEL
Androsterone (standard)	100	100
Aetiocholanolone	112	-
Dehydroepiandrosterone	100	144
11-Ketoaetiocholanolone	123	185
11- β -Hydroxyaetiocholanolone	96	100
11- β -Hydroxyandrosterone	65	74
Progesterone	42	-
Testosterone	36	-
11-Desoxycorticosterone	26	0
Cortisone	25	3
Cortisol (hydrocortisone)	19	0
Pregnane-3 α -ol-20-one	17	-
Corticosterone	-	0
Compound-S	-	2
17-Hydroxyprogesterone	-	10
Tetrahydrocortisone	-	8
Tetrahydrocortisol	-	0

=====

Aunque esta diferente cromogenidad es una desventaja teórica, no tiene gran significado en la práctica, pues cuatro de los seis primeros esteroides de la tabla tienen una similar intensidad de color y uno de ellos, la 11-cetoetilcolanona compensa con su alta reactividad, la 11-hidroxian-drosterona que tiene una producción de color menor. En la práctica, el valor total de los 17-cetoesteroides es estimado por los seis primeros componentes de la tabla 1, que constituyen el 74 % del total en hombres y el 83 % de las mujeres aproximadamente. Después de la administración de testosterona el 75 % de la misma es excretada en forma de estos seis primeros componentes.

I.3.2. Esteroides 17-cetogénicos (17-KGS)

Los 17-cetoesteroides que encontramos en la orina, son productos terminales, en el metabolismo de los andrógenos, producidos por la suprarrenal y en su mayor parte por el testículo, por lo tanto, sus variaciones indican fundamentalmente alteraciones en el funcionamiento de este último.

Los glucocorticoides y muchos de sus metabolitos tienen 21 átomos de carbono, gracias a la cadena lateral que se enlaza con la estructura principal a través del carbono 17.

Un ingenioso método para estimar estos últimos, fue desarrollado por NORYMBERSKY (1960). obteniendo un verdadero índice de actividad cortico-adrenal en el hombre, Este método consiste en una oxidación selectiva para eliminar la cadena lateral del carbono 17 y transformarlo en un grupo cetona

con lo cual se pueden determinar mediante la reacción de ZIMMERMAN. Tales esteroides capaces de producir mediante una oxidación selectiva 17-cetoesteroides, se denominan 17-cetogenicos. Todas las hormonas glucocorticoides son esteroides de este tipo y también muchos de sus metabolitos.

Los metabolitos, de las hormonas esteroideas poseen distintas cadenas laterales en C-17 y esto les hace variar considerablemente en su capacidad de oxidación a 17-cetoesteroides. Las reacciones que pueden ocurrir para estos diferentes tipos, pueden ser esquematizados en la forma siguiente (Tabla 2).

T A B L A 2

	21	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₂ OH	0	OH
Carbono	20	CO	CO	CHOH	CHOH		
	17	C..OH	C..OH	C..OH	C..OH	17-KS	17-OHS
TIPO		A	B	C	D		

El producto de la oxidación depende del agente oxidante empleado, como puede observarse en la tabla 3. tomada de C. L. COPE (1972).

T A B L A 3

TIPO	A	B	C	D	17-KS	17-OHS
An' idrido crómico	17-KS	17-KS	17-KS	17-KS	17-KS	17-KS
Acido periodico	A	17-KS	C	17-KS	17-KS	17-OHS
Bismutato sódico	A	17-KS	17-KS	17-KS	17-KS	17-OHS
Borohidrato sódico	B	B	D	D	17-OHS	17-OHS
Borohidrato + Bismutato sódico	17-KS	17-KS	17-KS	17-KS	17-OHS	17-OHS

Todos los metabolitos pueden ser oxidados por el anhídrido crómico a 17-cetoesteroides, el uso de este oxidante ha sido estudiado en profundidad por WILSON y FAIRBANKS (1955), pero no se ha extendido su adopción para propósitos clínicos. El ácido periodico, transforma las cadenas B y D en 17-cetos, pero no afecta a las cadenas A y C, con grupo hidroxilo, en el carbono 21. El bismutato sódico, oxida tres de las cuatro cadenas, dejando inalterable la del tipo A, pero las cantidades de metabolitos presentes en la orina de este último tipo es muy pequeña, con lo cual el bismutato puede ser usado con propósitos clínicos. En definitiva el bismutato sódico es capaz de convertir prácticamente todos los C-21 metabolitos de las hormonas glucocorticoides en 17-cetoesteroides cromogénicos.

Es de señalar que los 17-cetoesteroides inicialmente presentes en la orina no se ven afectados por esta oxidación

y persisten como tales. Esta es la base del método analítico se determinan primero los 17-cetoesteroides presentes en la orina, a continuación un duplicado de la muestra se somete a la acción del bismutato sódico, repitiéndose de nuevo la determinación de los 17-cetoesteroides, la diferencia entre ambas medidas nos dará los cuerpos de cadenas B C y D presentes que se denominan esteroides 17-cetogenicos. Este fue el principio del método desarrollado por BROOKS y NORZYMBERSKY (1953).

APPLEBY y Col. (1955) modifican el método, reduciendo primero la orina con borohidrato sódico y posteriormente tratandola con el bismutato. Esta preliminar reducción tiene dos efectos: 1º) transformar todos los 17-cetoesteroides originales en 17-hidroxiesteroides que no forman cromógenos con el reactivo de Zimmerman.- 2º) Transformar la cadena A resistente a la acción del bismutato, en cadena B, con lo que posteriormente en la oxidación se determinan todos los grupos, al convertirlos en 17-cetoesteroides. Como resultado de esto, solo es necesario una reacción con el reactivo de Zimmerman para determinar 17-hidroxicorticoides totales contenidos en la muestra. La reducción previa con borohidrato, produce sencillamente una rotura de la unión con el radical glucosido, no necesitándose posteriormente una hidrólisis muy intensa para hacer solubles los cetoesteroides formados en disolventes orgánicos. Appleby y Col. al referirse a los esteroides medidos por su método les denominan 17-hidroxicorticoides totales (T-17-OHS), esta denominación puede inducir a

confusión, con la determinación todavía en uso, de los 17-hidroxycorticoides estimados por el método de Porter y Silber. Es preferible utilizar para los esteroides medidos por el método de Appleby, la denominación de esteroides ceto-genéticos totales (T-17-KGS).

Clinicamente ambos métodos, el original de Norymberski y el posterior de Appleby pueden ser utilizados, ambos tienen un razonable grado de precisión y de reproductibilidad, son bastante específicos, aunque existen distintos tipos de medicamentos que pueden producir interferencia.

APPLEBY y Col. (1955) demostraron que metabolitos del cortisol agregados a las muestras de orina, son recuperados con un porcentaje que varía del 80 al 98 %. NORZYMBERSKI (1960) recuerda que la eficacia del método, debe ser regularmente controlada en cada serie de determinaciones de rutina, determinación de la recuperación del pregnantriol o tetrahydro-11-desoxicortisol añadido a las muestras. Este control es imprescindible cuando se renuevan los reactivos.

La precisión del método fue bien establecida por BIRKE y Col. (1958) en una serie de 688 muestras por duplicado encontrando una excreción diaria de 10 a 80 mgr/día, con un coeficiente de variación menor del 10 % y en niveles patológicos (hipofunción), una eliminación diaria menor de 5 mgr/día.

El uso del bismutato como agente oxidante tiene una serie de desventajas, DICZFALUSY y Col.(1958), demuestran

que estas se deben en su mayor parte a la impureza de los reactivos. Además el hecho de que los productos finales sean una mezcla de 11-hidroxi y 11-cetos, 17-cetoesteroides de diferente nivel colorimétrico puede influir aleatoriamente sobre los resultados.

Para eliminar este inconveniente FEW (1961) recomienda utilizar como oxidante, periodato en lugar de bismutato obteniéndose en los productos finales de la oxidación una cantidad mínima de 11-cetoetiocolanolona. Las diferencias entre duplicados que encuentra Few son superiores al 10 % y los valores medios encontrados en la eliminación de 24 h. son de 10,7 mgr. para los 11-hidroxi-17cetos. y de 2,5 mgr/día para los 11-ceto-17-cetos.

Una serie de ensayos para la validez del método ha sido realizado por MOXHAM y NABARRO (1956), en pacientes adrenalectomizados con terapéutica oral de hidrocortisona y cortisona han determinado la excrección urinaria de esteroides 17-cetogénicos, obteniendo una buena relación lineal entre las dosis dadas y los 17-KGS recuperados. Para dosis de 20 a 60 mgr. de acetato de cortisona, la recuperación obtenida ha sido de un 40 % aproximadamente. Es razonable suponer que los 17-esteroides cetogénicos urinarios, representan alrededor del 40 % del total de la secreción diaria de cortisol.

COPE y BLACK (1958) compararon la tasa de secreción diaria de cortisol determinada por métodos isotópicos con

la excreción diaria de esteroides 17-cetogenicos, demostrando que estos ultimos representan aproximadamente el 50 % de la secreción total de cortisol.

1.3.3.- Cortisol libre urinario

La cantidad de cortisol libre presente en la orina es muy pequeña y por lo tanto ha sido relativamente difícil su determinación. En 1955 COPE y HARRISON, describieron un caso de inhibición adrenal que se puso de manifiesto por un fallo en la excreción urinaria de cortisol libre y no por la excrección de 17-oxogenicos esteroides. En 1956 COPE, señala el valor de el cortisol libre urinario como indice de respuesta en la hiperplasia o en el carcinoma suprarrenal a los test de supresion y en 1959 COPE y BLACK manifiestan la gran sensibilidad del cortisol libre urinario para revelar los cambios de la actividad adrenal. El método analítico utilizado por estos autores fue el desarrollado por COPE y HURLOCK (1952) que tiene una exactitud de solo el 20 % aproximadamente.

El rango de la concentración de cortisol libre urinario en enfermos convalecientes de enfermedades no endocrinas varía desde 0 a 100 $\mu\text{gr}/\text{día}$. En la Fig. 1 pueden observarse los datos de BEARDWELL y Col. (1968).

En sujetos normales pueden encontrarse valores cercanos a cero, lo que invalida este método para el diagnostico de casos de hipofunción. Con los modernos métodos mucho más sensibles, esta anterior afirmación puede no ser valida,

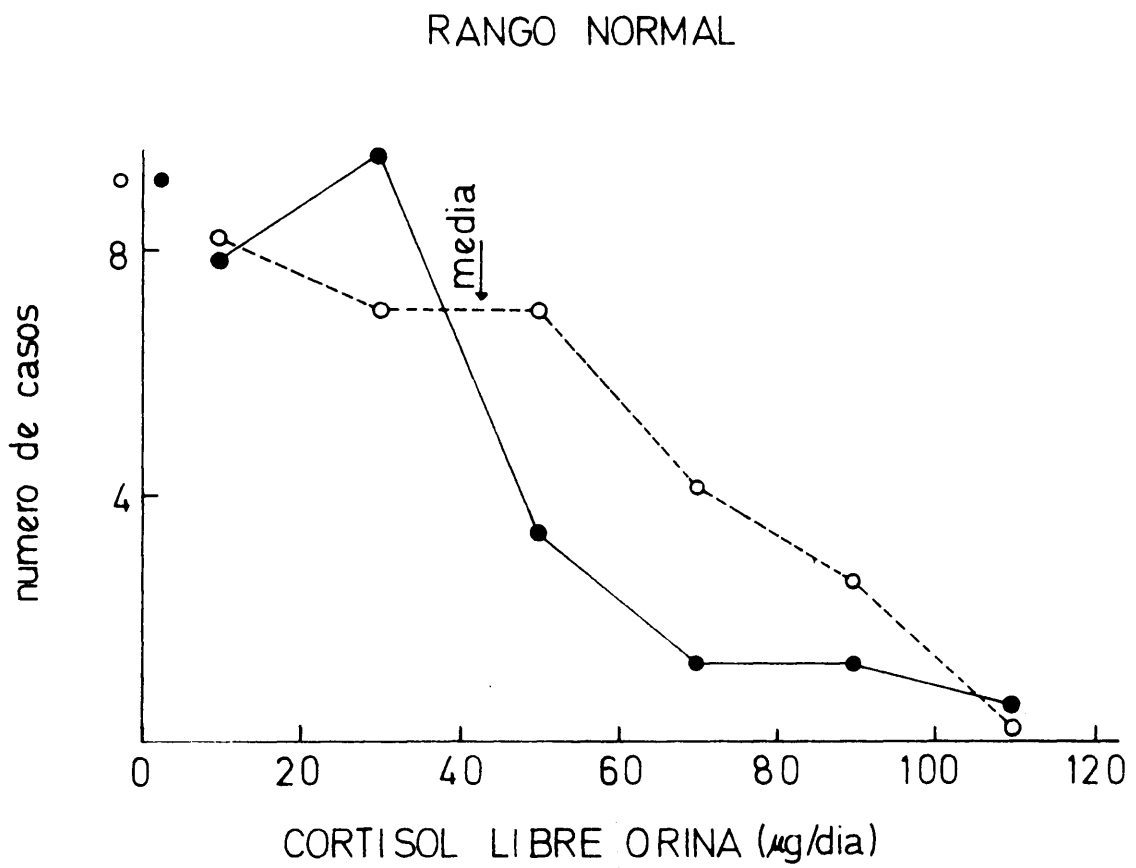


FIG. 1.- Cortisol libre en orina en distintos sujetos normales(O-O) datos de 1958. (●-●) datos de 1959.- BEARDWELL y Col. (1968)

HSU y BLEDSOE (1970), por ejemplo, utilizando técnicas de saturación (C.P.B.) obtienen un método lo suficientemente sensible como para distinguir, los hipoadrenalismos de los sujetos normales. En 54 sujetos normales estos autores encuentran valores de 16 a 71 $\mu\text{gr}/\text{día}$, mientras que en sujetos con hipofunción adrenal, el rango varía de 0 a 14 $\mu\text{gr}/\text{día}$. En las series estudiadas no existían superposición entre los dos grupos.

En los estados de hiperfunción adrenal, la excrección de cortisol libre está invariablemente por encima de 90 $\mu\text{gr}/\text{día}$, la superposición con el rango normal ($< 100 \mu\text{gr}/\text{día}$) es muy pequeña y de todas formas es mejor índice que la excrección de esteroides 17-cetogénicos, en donde el grado de superposición entre normales e hiperadrenalismos es mucho mayor. Cuando en el caso de un Síndrome de Cushing se miden diferentes parámetros y los resultados se expresan, no en $\mu\text{gr}/\text{día}$, sino en porcentaje respecto a la media normales, la excrección urinaria de cortisol libre, resulta ser el mejor indicador. COPE y BLACK (1959) estudiaron una serie de 12 ca sos de Síndrome de Cushing, en los cuales, el nivel medio en la excrección de cortisol libre urinario fue de ocho veces el valor medio en sujetos normales, mientras que la excrección de los esteroides 17-cetogénicos, respecto al valor normal, fue solo de una a cuatro veces mayor. Los niveles de excrección de tetrahidrocortisona y tetrahidrocortisol fueron considerablemente menores.

Esta alta sensibilidad del cortisol urinario como un índice del incremento de la actividad adrenal es probablemente debida a una saturación de la transcortina en plasma, pues un aumento de cinco veces la concentración normal de cortisol en plasma, incrementa de 15 a 20 veces la cantidad de cortisol no ligado a transcortina y éste último como es sabido es eliminado por la orina en la filtración glomerular.

Un aumento de la cantidad de cortisol libre urinario puede aparecer en aquellos sujetos, no afectados de síndrome de Cushing, que sufran enfermedades crónicas consuntivas que cursen con marcada hipoproteïnemia. MANCHEÑO y Col. (1976), estudiando distintos tipos de cancerosos en grado avanzado y descartando el síndrome de ACTH ectópico, demuestran un aumento de cortisol libre urinario, que únicamente puede ser atribuido a déficit de transcortina.

Las conclusiones generales de COPE y BLACK (1959) respecto al índice diagnóstico del cortisol libre urinario en casos de hiperfunción han sido confirmados por otros autores FRANKEN y ZIMMERMAN (1962) y también ROSS (1960).

ROSNER y Col. (1963) han desarrollado un buen método para su estimación basado en una previa cromatografía en columna y han confirmado también la pequeña superposición en los valores correspondientes a sujetos normales y en sujetos con síndrome de Cushing.

El desarrollo de un método relativamente simple para

estimar el cortisol libre urinario, mediante una tecnica de saturación (C.P.B.) ha conseguido que este índice pueda ser utilizado de rutina. El método usado por MURPHY (1967) para estimar el cortisol plasmático es igualmente aplicable a la orina y ha sido descrito por MURPHY (1968) y por BEARDWELL y Col. (1968). Este último grupo encuentra un valor medio normal de 43 μ gr/día, el mismo que encontraron COPE y BLACK en 1959 y la estimación puede ser realizada en una muestra no mayor de 5 ml.

En esta tesis utilizamos el método descrito por MANCHEÑO y Col. (1975) para la estimación del cortisol libre urinario que no utiliza una separación cromatográfica previa.

I.4.- Pruebas rápidas de función adrenal

Vamos a describir las denominadas pruebas rápidas de función adrenal, porque pueden ser realizadas en 24 horas y no requieren la hospitalización de los sujetos objetos de las mismas. Estas pruebas son cuatro: a) Valores basales .- b) Estimulación con corticotropina c) Estudio del ritmo espontaneo y d) Supresión del eje hipotálamo hipofisis-suprarrenal con un corticoide de alta potencia sintético (tipo dexametasona). El índice utilizado para valorarlas es la concentración plasmática de glucocorticoides, habitualmente cortisol (C.P.B.), o 11-OH-CS plasmáticos (fluorimetría). Son pruebas para utilizar de rutina en una gran cantidad de sujetos a modo de "screening" y los diagnósticos de sospecha encontrados suelen ser habitualmente confirmados utilizando pruebas mas específicas.

I.4.1.- Prueba de estimulación con β^{1-24} corticotropina

La estimulación con β^{1-24} corticotropina, midiendo la respuesta de los 11-OH-CS plasmáticos se emplea como una prueba rápida de función adrenal. W. R. GREIG y Col. (1967) han desarrollado en profundidad el tema y standarizado la aplicación de esta prueba, según resumimos a continuación.

El Nuvacthen (β^{1-24} corticotropina) tiene las ventajas de su excelente solubilidad en agua y ser un compuesto químicamente puro y por lo tanto la aparición de reacciones inmunológicas, es mucho más rara que usando la corticotropina natural (BELL y Col. (1956), FLEISCHER y Col. (1965), JENNY y Col (1963), LANDON y Col (1964)).

Estos autores realizan la prueba disolviendo la β^{1-24} corticotropina en 0,5 ó 1 ml. de suero salino y administrándolo intramuscularmente en músculo glúteo o deltoides. El cortisol plasmático lo miden como 11-OH-CS, mediante el método de MATTINGLY (1962) modificado.

En sus estudios preliminares encuentran coincidiendo con LANDON y Col. (1964), WOOD y Col. (1965), etc. que la respuesta adrenal al β^{1-24} corticotropina es equivalente a la encontrada con la corticotropina natural, GREIG y Col (1966). En sujetos sin enfermedades endocrinas, los 11-OH-CS plasmáticos se incrementan ostensiblemente a los 30' de la administración i.m. de 250 mgr de β^{1-24} corticotropina. La máxima concentración plasmática de los 11-OH-CS se obtiene a los 60' y retorna a los niveles basales des-

pues de 180 a 240 minutos. El incremento de los 11-OH-CS encuentran que es mas reproducible a los 30' que a los 60' y la respuesta no está alterada significativamente por una actividad moderada.

En otro estudio encuentran que esta respuesta no se modifica significativamente al aumentar la dosis de corticotrofina sintética (500 mgr), como puede observarse en la Fig. 2.

La Fig. 3 demuestra que el incremento de los 11-OH-CS plasmáticos producido por la corticotrofina sintética, es analogo al que se produce despues de una infusión durante 30' de 10 u.i. de corticotrofina soluble porcina, ambas pruebas se realizaron en los mismos sujetos.

En otro estudio la respuesta al β^{1-24} corticotrofina fue medida en tres diferentes momentos del día (mañana, tarde y noche), en sujetos sin alteraciones endocrinas y con un ritmo circadiano normal de cortisol. En la Fig. 4 puede observarse que la respuesta al β^{1-24} corticotrofina si se compara con la concentracion de 11-OH-CS antes de la prueba es analoga.

El estudio se completa estableciendo sus criterios de valoración de esta prueba en distintas situaciones clínicas. En 45 sujetos normales (sin endocrinopatías), aplicaron la prueba de estimulacion como se ha descrito anteriormente, estos sujetos no estaban sometidos a terapeutica con corticoides siendo normales las pruebas de función renal y hepática. El test fue practicado entre las 8 y 10 a.m. no estan

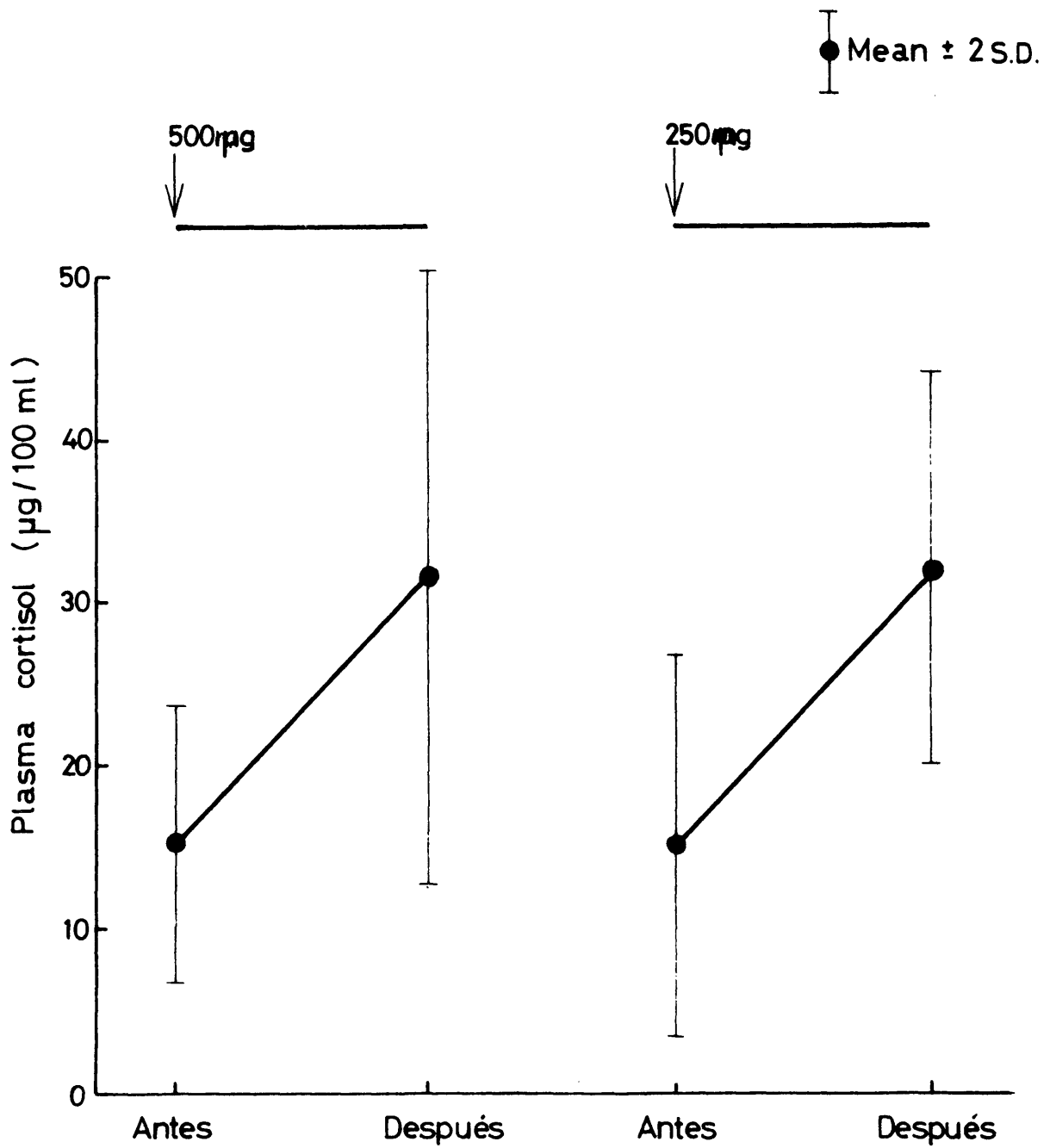


FIG. 2.- Comparación de las respuestas a distintas dosis de β^{1-24} corticotrofina. Tomada de GREIG y Col. (1968)

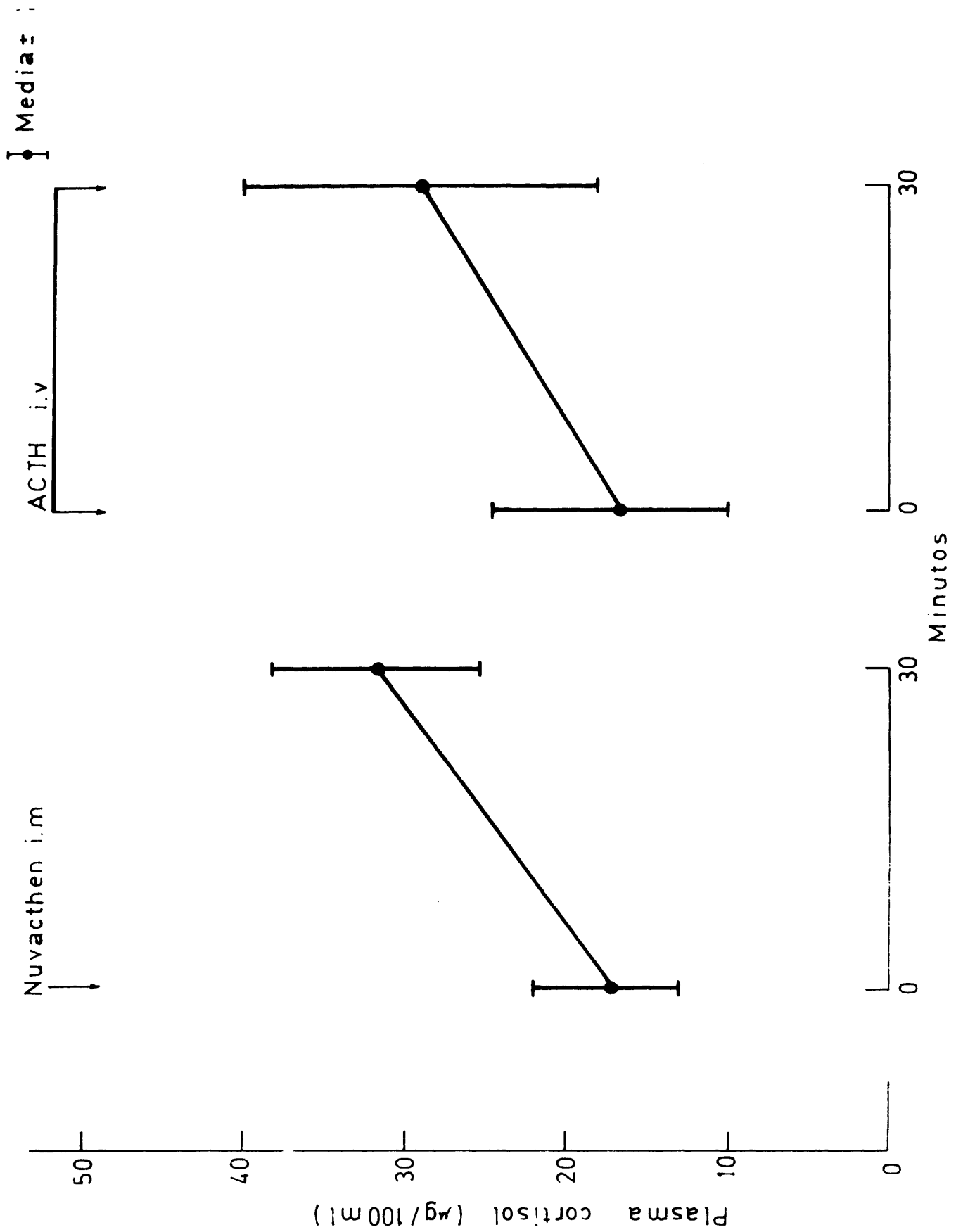


FIG. 3.- Comparación de las respuestas al β^{1-24} corticotrofina y corticotrofina soluble porcina. Tomada de GREIG y Col. (1968).

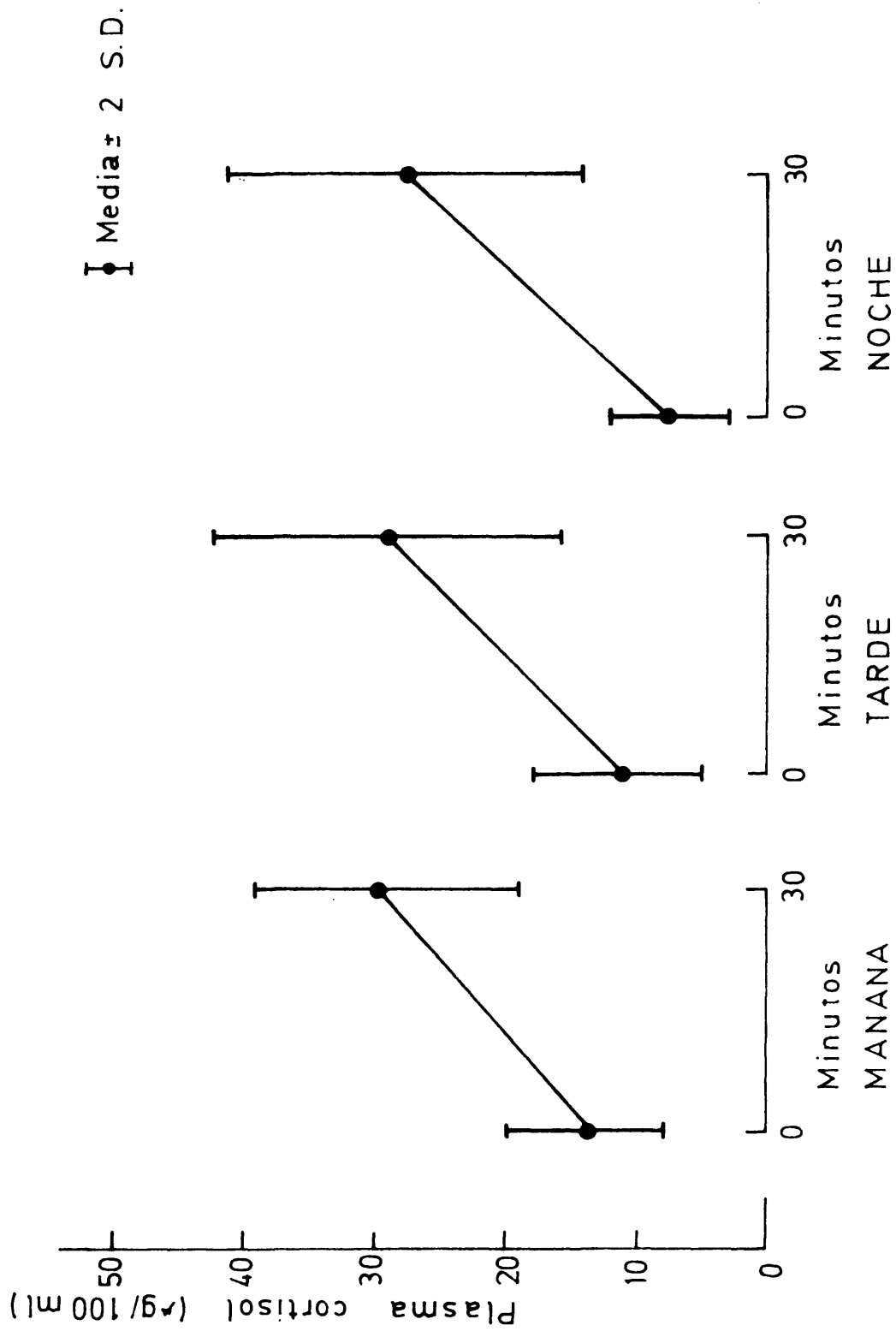


FIG. 4.- Comparacion de las respuestas al β^{1-24} corticotrofina en distintos momentos del día. Tomada de GREIG y Col. (1968)

do los sujetos acostados. Antes de la administración de β^{1-24} corticotrofina los valores de 11-OH-CS plasmáticos encontrados fueron de 7,2 a 25,8 $\mu\text{gr}/100\text{ ml}$ ($\bar{x} = 15,5$ $\mu\text{gr} \%$). Treinta minutos después de la administración los valores que encontraron fueron de 21,5 a 44 $\mu\text{gr} \%$ ($\bar{x} = 32,25$ $\mu\text{gr} \%$), el incremento obtenido en cada sujeto variaba de 7,7 a 26,1 $\mu\text{gr}/100\text{ ml}$. ($\bar{x} = 16,4$ $\mu\text{gr} \%$). Estos tres valores basal, final e incremento son independientes, por esta razón los criterios que aplican para definir una respuesta normal son:

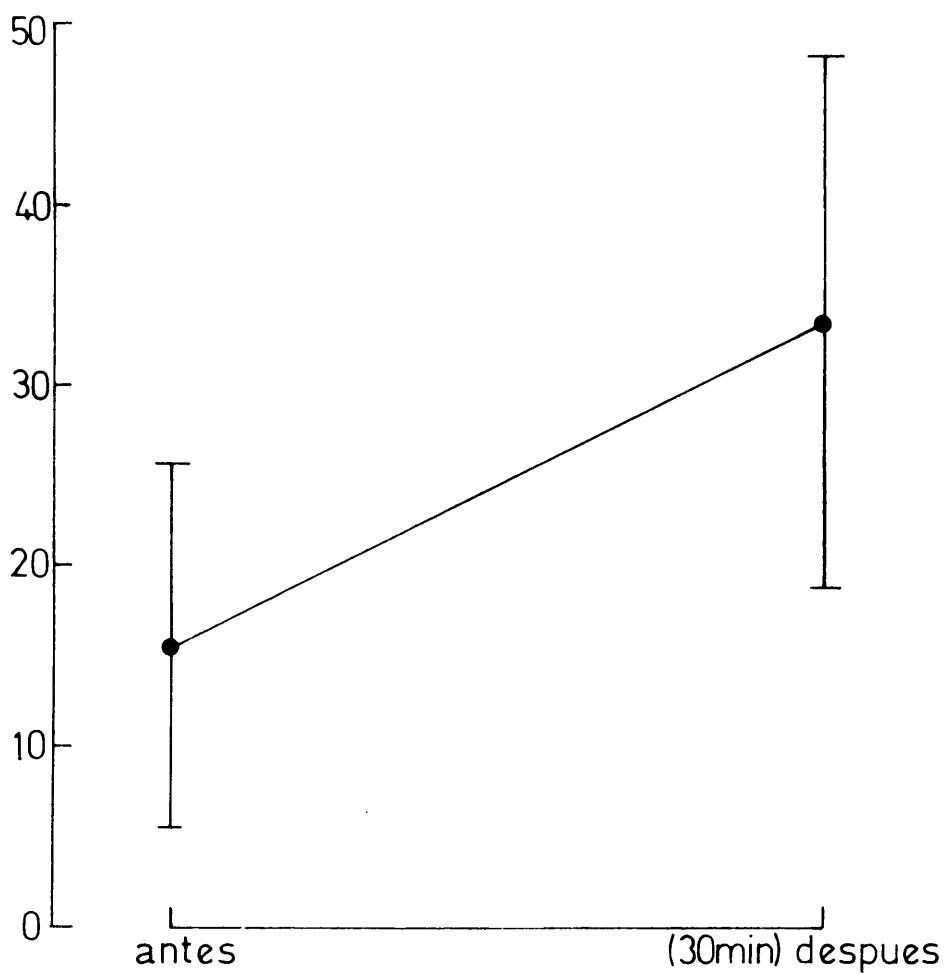
- a) El nivel basal de 11-OH-CS plasmáticos a las 9 a.m. de un sujeto normal, no debe ser inferior a 6 $\mu\text{gr}/100\text{ ml}$
- b) A los 30' de la aplicación intramuscular de 0,25 mgr de β^{1-24} corticotrofina el nivel de 11-OH-CS plasmáticos, no puede ser inferior a 18 $\mu\text{gr}/100\text{ ml}$.
- c) El incremento absoluto encontrado, no puede ser menor de 7 $\mu\text{gr}/100\text{ ml}$.

Estos tres criterios pueden observarse en la Fig. 5 tomada de estos autores.

I.4.2.- Estudio del ritmo espontaneo de secrección

Como otros organos de la economía, la corteza adrenal tiene una variación ritmica regular de su actividad a lo largo de las 24 horas. A este tipo de ritmos HALBERG (1950) los denominó circadianos. Este tipo de variación, independientemente de otras variaciones aleatorias, fue descubierto por primera vez en la adrenal por BLISS y Col. (1953) y confirmado por GEMZELL (1955) y ENGEL y Col. (1955),

● media ± 25D



Pasma cortisol(µg100ml)

FIG 5.- Criterios de valoración en la prueba de estimulación con 250 mgr. de β^{1-24} corticotrofina. Tomada de GREIG y Col. (1968)

sin embargo el primero en sospechar su existencia fue PINCUS (1943).

En circunstancias normales el valor mas alto de cortisol en plasma se encuentra alrededor de las 8 a.m. y su valor mínimo entre las 9 p.m. y medianoche. Durante la noche existe un pico de secreción hacia las 5 a.m. mientras el sujeto esta durmiendo (Fig. 6). Este ritmo circadiano de cortisol está provocado por un ritmo en la secreción de A.C.T.H. hipofisario, NEY y Col (1963), pues estos cambios no pueden ser atribuidos a variaciones en la tasa de metabolización del cortisol, como comprobaron manteniendo una infusión constante de cortisol en pacientes Addisonianos, no detectandose ningun cambio en la concentración de 17-OH-CS plasmáticos.

Mas recientemente KRIEGER y KRIEGER (1971), han determinado en 4 sujetos normales los niveles de 11-OH-CS plasmáticos por fluorimetría y A.C.T.H. por R.I.A., tomando muestras cada media hora, observaron el ritmo circadiano de cortisol como una consecuencia del ritmo circadiano de A.C.T.H. (Fig. 7).

HELLMAN y Col. (1971) han realizado un estudio analogo en seis sujetos normales aclimatados, tomando muestras cada 20' durante veinticuatro horas, en la Fig. 8 tomada de este trabajo puede tambien observarse el ritmo circadiano de cortisol plasmático.

El estudio del ritmo espontaneo de secreción, tomando una muestra a las 8 a.m. y otra a las 6 p.m. o preferen

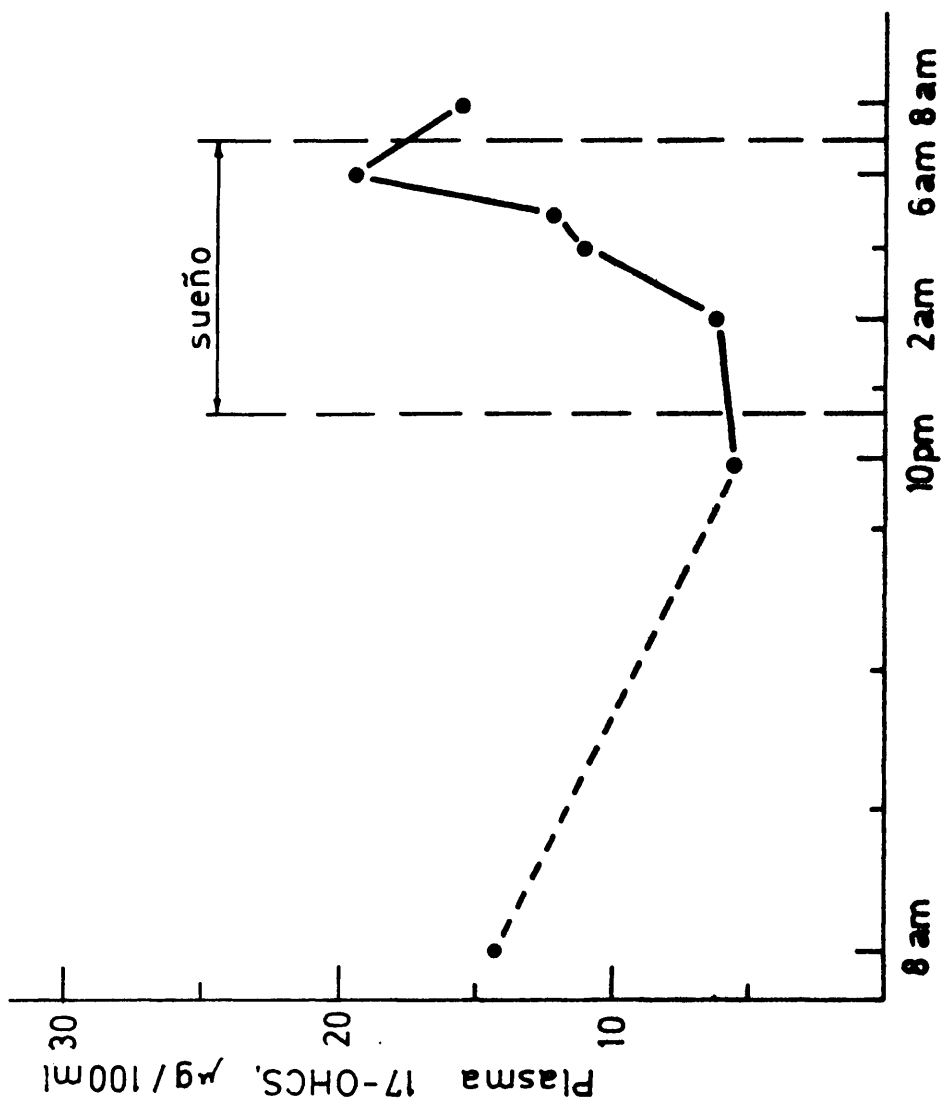


FIG. 6.- Ritmo espontaneo de secrección de cortisol en un sujeto normal, midiendo la concentración de los 17-OH-CS plasmáticos.

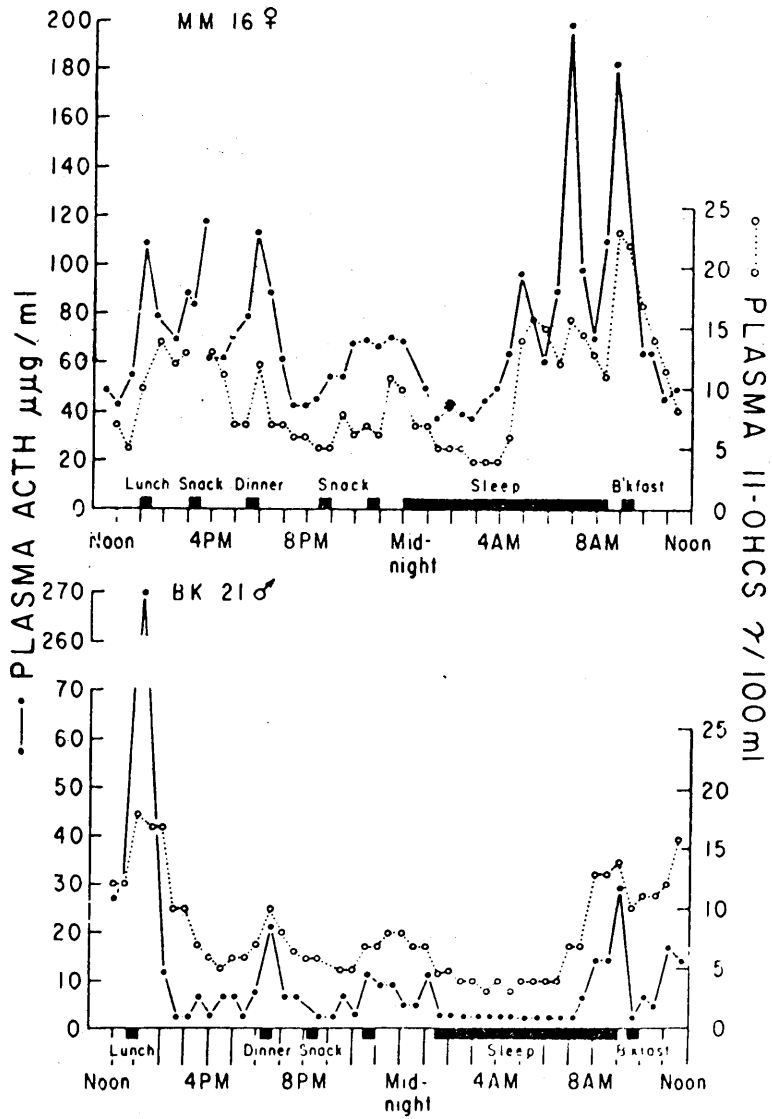


FIG. 7.- Ritmo circadiano de cortisol en dos sujetos normales como consecuencia del ritmo circadiano de A.C.T.H. Tomada de KRIEGER y KRIEGER (1971)

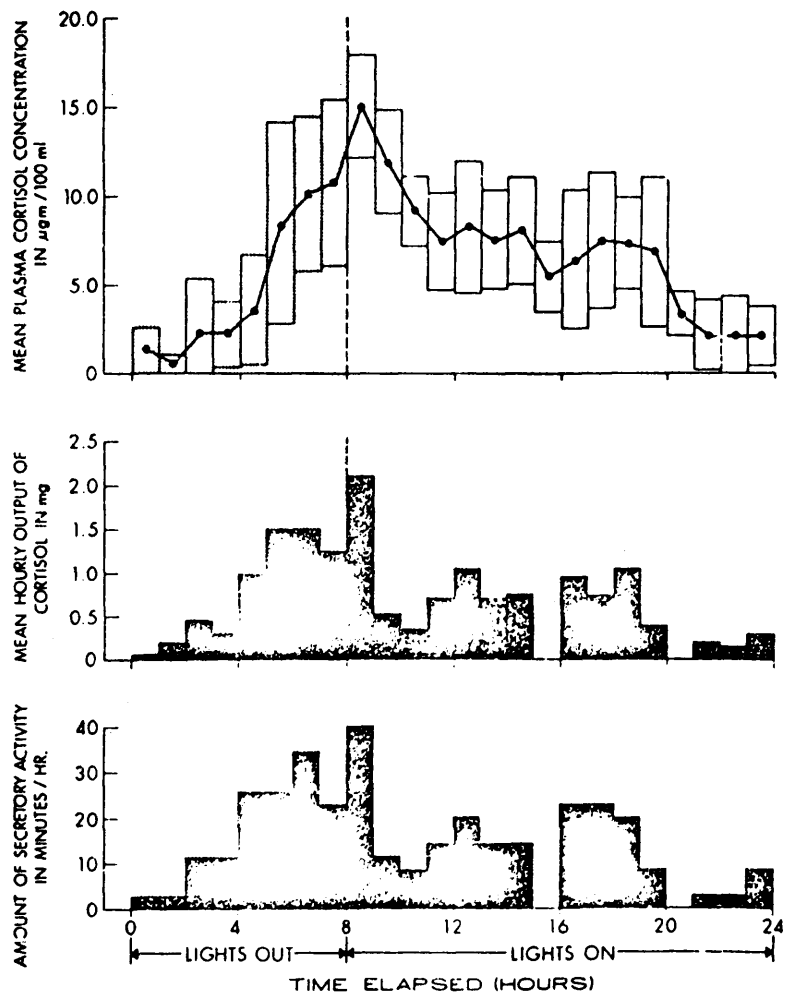


FIG. 8.- Ritmo circadiano de cortisol, de 7 sujetos normales.

Tomada de HELLMAN y Col. (1971)

temente a media noche se ha convertido en una prueba clínica en el estudio de los hipercorticismos, los valores aceptados generalmente son, a las 6 p.m. los valores de 11-OH-CS plasmáticos han de ser menores de 15 $\mu\text{gr}/100\text{ ml.}$ y a media noche inferiores a los 8 $\mu\text{gr}/100\text{ ml.}$

I.4.3.- Supresión del eje hipotálamo-hipofisis-suprarrenal

Desde 1952 se sabe que la administración de cortisona inhibe la excesiva actividad adrenal asociada a la hiperplasia suprarrenal congénita. JAILER y Cols. (1953) encuentran que la administración de cortisona disminuye la excreción de 17-KS en el síndrome de Cushing. La primera demostración dada en esta inhibición fue obtenida por COPE y HARRISON (1955) aunque la sensibilidad del eje fue relativamente baja y solo revelada por el descenso en la excreción de cortisol libre urinario. Al año siguiente COPE (1956) extiende estas observaciones a cinco nuevos casos, de los cuales cuatro eran hiperplasias y el quinto carcinoma suprarrenal. El glucocorticoide usado fue 9 α -fluorocortisol y el índice para medir el grado de supresión el cortisol libre urinario.

Poco a poco se va imponiendo el criterio de supresión como una prueba más, en el diagnóstico de los hipercorticismos y LIDDLE (1960) sugiere que la prueba de supresión con dexametasona (16 α -metil-9 α -fluoro-cortisol) debe ser la base de los tests diagnósticos del síndrome de Cushing. LIDDLE, administra la dexametasona en dosis de 0,5 mgr.

cada 6 horas, durante 48 horas y la respuesta adrenal la determina midiendo la excrección diaria de 17-OH-CS en orina. En estas circunstancias encuentra que la excrección al segundo día de 17-OH-CS en sujetos normales ha de ser menor de 2 mgr, con un valor medio de 1,1 mgr. En 65 enfermos sospechosos de hiperadrenalismo, pero con excrección normal de 17-OH-CS la aplicación de esta prueba dio al segundo día una excrección menor de 2 mgr., en 55 de ellos y entre 2 y 4 mgr. en los otros 10. En enfermos con síndrome de Cushing diagnosticado, con tasas altas de excrección de 17-OH-CS urinarios y con hiperplasia bilateral confirmada todos tienen una resistencia a la supresión. En 27 enfermos de estas características, ninguno dio al segundo día valores de 17-OH-CS inferiores a 4 mgr. y en 16 casos de estos 27, no se manifestó ninguna reducción en la excrección de 17-OH-CS. La segunda etapa del test fue la administración de 2 mgr de dexametasona cada 6 horas durante 3 días a los 16 sujetos que con dosis menor no habían sufrido ningún cambio en su excrección urinaria de 17-OH-CS, obteniendose en todos los casos una reducción al tercer día de alrededor del 50 % respecto a sus valores basales. Por último fue estudiado otro grupo de 8 pacientes con claro síndrome de Cushing y en los que se sospechaba un carcinoma adrenal. En ninguno de ellos, ni utilizando dosis altas (8 mgr/día) se obtuvo ninguna reducción en la cifra de los 17-OH-CS excretados al tercer día.

Como resultado de estos estudios LIDDLE propugno esta prueba como diagnostica del síndrome de Cushing y

válida para separar dentro de este último, los casos debidos a hiperplasia de los debidos a tumor suprarrenal.

La aplicación del test de LIDDLE ha sufrido distintas transformaciones, NICHOLS y Col. (1965), demuestran que la dexametasona dada por la noche provoca un mas largo periodo inhibitorio, que administrada a igual dosis por la mañana. NUGENT y Col. (1965) al igual que BRICAIRE y Col. (1967) y SEIDENSTICKER y Col. (1967) administran 1 mgr. de dexametasona a media noche y determinan la concentración plasmática de cortisol a las 8 a.m. del día siguiente.

En esta tesis hemos aplicado el test de supresión con dexametasona, en la forma aconsejada por NUGENT, es decir administrando 1 mgr. a las 23 h. y midiendo la concentración de 11-OH-CS plasmáticos a las 9 a.m. del día siguiente. El valor comunmente aceptado, es que esta determinación debe ser inferior en cualquier caso (normal) de $7 \mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$

II.- OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La valoración analítica de la función suprarrenal es en Medicina, tema de extraordinaria importancia, no solo en aquellos casos en los que el diagnóstico clínico es dudoso sino también en aquellos enfermos cuyo tratamiento prolongado e intensivo con corticoides de síntesis ponen en peligro la integridad funcional de las glándulas suprenales.

La dificultad práctica de la recogida de la diuresis completa nos hace, especialmente en enfermos ambulatorios, inclinarnos hacia las pruebas plasmáticas. En nuestra experiencia personal hemos observado la no existencia de criterios claros para evaluar los resultados que se obtienen en las distintas pruebas y es esto uno de los objetivos fundamentales que justifican este trabajo.

El contenido de esta tesis se puede separar en tres objetivos que han requerido de diseños específicos para cada uno:

- 1º.- Control plasmático como índice de función suprarrenal y su utilización para la valoración clínica de un polipéptido corticotrófico de síntesis.
- 2º.- Valoración de las pruebas funcionales de estimulación supresión del eje hipotálamo-hipofiso-suprarrenal y del mantenimiento de su ritmo espontáneo a través de los niveles de cortisol plasmático en una población ambulatoria sin patología endocrino-metabólica o renal
- 3º.- Cuantificación del cortisol libre urinario por dos métodos

de principio distintos, tales como fluorometria y desplazamiento competitivo o análisis por saturación.

III.- MATERIAL Y METODOS

III.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VALORACION CLINICA DE LA CINETICA DE LA RESPUESTA A UN OCTADECAPÉPTIDO DE SINTESIS

III.1.1.- Sujetos experimentales.-

Se han utilizado como sujetos experimentales para la valoración de las pruebas de estimulación con el tetracosáctido y el octadecapeptido, 17 varones sanos voluntarios remunerados, cuyas edades estaban comprendidas entre los 21 y 33 años. Todos ellos eran normales y con un peso que caía dentro de la normalidad: altura $1,75 \pm 2,9$ cms y peso 75 ± 5 Kgs. (media \pm error standard).

III.1.2.- Diseño experimental

En el estudio comparativo, el tetracosáctido y el octadecapéptido fueron suministrados por CIBA en forma de ampollas estériles listas para su inyección. La administración se realizó en todos los casos entre las 8,30 y las 9,30 de la mañana tomándose muestras de sangre, antes y a 1/2, 1, 2, 4, 8, 12, 24, y 48 horas de la inyección. Entre dos administraciones a un mismo sujeto, se dejaron pasar un mínimo de 7 días y en cada caso el orden de administración se randomizó para minimizar la influencia de un experimento sobre el siguiente.

III.1.3.- Métodos de Laboratorio.

La sangre recogida en tubos heparinizados fue cen-

trifugada inmediatamente y los plasmas congelados a -16°C hasta el momento de su análisis. La orina de 24 horas fue mandada recoger y guardar en nevera hasta el momento de su entrega al laboratorio.

A continuación describimos el método fluorimétrico de MATINGLY y el método de APLEBY tal como se realiza en el laboratorio de Hormonas del Hospital Clínico de SanCarlos y el método del desplazamiento competitivo tal como lo realizamos en la cátedra de Endocrinología Experimental, de la Facultad de Medicina, Univ. Complutense.

1) Método de Matingly: Se trata de un método fluorimétrico basado en la fluorescencia emitida por los esteroides 11 hidroxilados en medio ácido. Este método mide el cortisol y la corticosterona del plasma, (11-hidroxicorticoides) pero como la concentración plásmatica de corticosterona, no sobrepasa de $1\mu\text{g}/100\text{ ml}$. se acostumbra simplemente a referirse al cortisol plasmático.

a) Reactivos:

-Dicloruro de metileno RP Carlo Erba (debe controlarse la fluorescencia base por cada nueva remesa de reactivo, siguiendo la técnica fluorimétrica más abajo descrita).

-Acido sulfúrico concentrado RP Carlo Erba.

-Etanol absoluto Merck (para análisis).

b) Reactivo de fluorescencia:

- Acido sulfúrico: Etanol (75:25) añadir lentamente 7,5 volúmenes de SO_4H_2 concentrado frío sobre 2,5 volúmenes de Etanol absoluto en baño maria de hielo.
- Evitar desarrollo de calor y si la solución toma color pardo, purificar el etanol o emplear otro. Una vez preparado el reactivo estable, en frasco de vidrio bien tapado y en nevera hasta un mes.
- Hidróxido sódico 1 Normal.
- Cortisol (F_K) o hidrocortisona Sigma H-4001
- Solución madre de cortisol 2,5mg/ml, en etanol.
- Solución standard de cortisol 25 μg /ml en agua destilada hasta 100 ml. Estas soluciones son estables en refrigerador hasta un año.
- Solución de trabajo de cortisol: 0,25 μg /ml. en agua destilada 1 ml de la solución standard diluida hasta 100 ml con agua destilada.

c) Extracción:

- Extraer 10 ml. de sangre heparinizada (utilizar heparina libre de alcohol bencilico). Centrifugar y separar el plasma tan pronto como sea posible.

Las muestras se conservan en nevera hasta una semana y en congelador varios meses.

d) Técnica:

- Añadir en un tubo con tapon esperilado, 15 ml. de cloruro de metileno y 2 ml. de plasma.

- Tapar bien con tapón de polietilino y extraer 10' en agitador rotativo a 33 r.p.m.
- Separar el plasma por aspiración y lavar una vez con hidróxido sódico. 0,1 Normal y una vez con 2 ml. de agua destilada.
- Procesar en cada serie en blanco de reactivos, un patron de cortisol (2 ml. de la solución de trabajo (0,5 μ g) y un plasma de control de calidad. 10 ml. de cloruro de metileno se trasvasa a tubos limpios para la fluorimetría.
- En el tiempo cero añadir 3 ml. del reactivo de fluorescencia sobre los 10 ml. de cloruro de metileno, agitar vigorosamente durante 20 ".
- Separar la capa orgánica por aspiración y transferir la capa ácida a la cubeta del fluorímetro. La lectura debe hacerse entre los 12 y 15 ' después de haber agitado los extractos con el reactivo de fluorescencia.

e) Condiciones de trabajo con el:

- Fluorimétre Perkin-Elmer MBF - 2A
- Longitud de onda de excitación 470 m.
- Longitud de onda de emisión 520 m.

f) Cálculos:

$$\mu\text{g Cortisol}/100 \text{ ml.} = \frac{\text{Fluor. Prob.} - \text{Fluor. blanco}}{\text{Fluor stand.} - \text{Fluor. blanco}} \times 25$$

en $\mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$

2) Metodo de Apleby: La reacción de Zimmerman, ha sido aplicada a la formación y cuantificación de cromogenos de esteroides poseedores de una función cetónica en el carbono-17 (17-KS), durante casi cincuenta años (Zimmerman, 1935).

Desde hace dos décadas se extendió su aplicación clínica a la medida de aquellos esteroides urinarios que por poseer una función hidroxilo en posición 17 (17-OHS), podrían ser oxidantes a 17-KS, por lo que se denominan también esteroides 17-cetogénicos y pueden ser cuantificados asimismo por la reacción de Zimmerman (Norymberski y col., 1953; Apleby y col., 1955; Gray y col., 1969).

a) Reactivos:

- Aldehído fórmico al 40% en vol RP Carlo Erba
- Alcohol octílico p.s. Merck.
- Borhidruro potásico Sigma num. P-4129. Preparar una solución al 15 por ciento de borhidruro potásico en NaOH 0,1 N. (Preparación extemporánea).
- Dicloruro de metileno RPE. Carlo Erba.
- Etanol 95 por ciento Uvasol Merk para espectrofotometría.
- Hidroxido potásico 4,5 N.
- Clorhidrato de bencetonio o Hiamina-1622 Sigma, num. B-8879. Preparar solución acuosa de H-1622 al 2,5 por ciento P/V con el 0,2 por ciento de m-dinitrobenceno. Disolver con ayuda de agitador magnético, filtrar, com-

pletar el volumen con agua destilada y guardar en frasco tapado.

- Meta-dinitro benceno Sigma grado V, num. D-6379. Preparar solución de m-DNB al 1 por ciento P/V en etanol 95 por ciento (Preparación extemporánea).
- Metóxido de bencil trimetil amonio al 40 por ciento en metanol, Sigma num. B-9878.
- Etanol al 50 por ciento en agua destilada.
- Dehidro-epi-androsterona (DHEA) Sigma, num D-4000. Preparar solución stock de DHEA 1 mg/ml en etanol 95 por ciento. A partir de este, preparar la solución de trabajo de DHEA 50 mcg/ml. en etanol 95 por ciento. Estas soluciones son estables en refrigerador varios meses.

b) Material utilizado:

- Tubos con tapon esmerilado de 30 ml. de capacidad, Pobel.
- Pipetas automáticas y dispensadores tipo Oxford de distintos volúmenes.
- Agitador rotativo para tubos, con 30 r.p.m. de velocidad mínima, tipo Heidolph.
- Espectrofotómetro tipo Coleman Junior II
- Autoanalizador Technicon AA II, compuesto de:
 - a) Muestreador con capacidad para 40 muestras simultáneas.
 - b) Bomba dosificadora.
 - c) Baño de aceite con doble serpiente de 40 pies de

longitud y 1,6 mm. de diámetro interno y temperatura regulable hasta 140°C.

d) Colorímetro SCIC con cubeta tubular para flujo continuo de 15 mm. y filtros de 520 mm.

e) Registrador.

c) Métodos:

La metodología usada, común para la cuantificación manual o automatizada de los 17-KS 17-OHS, totales urinarios sigue en sus pasos a hidrólisis, extracción y purificación del extracto, básicamente el método descrito por Gray y col. en 1969, el cual incorpora la modificación de Few (1961) a la técnica original de Appleby y col. (1955) y que consiste en sustituir el bismutato sódico por metaperiodato para la oxidación de los 17-OHS. Su descripción diagramática se halla representada en la tabla 4.

Para la reacción de Zimmermann, en el método manual utilizamos metóxido de bencil trimetil amonio al 40 por ciento en metanol, como base orgánica, según introdujo Bongiovanni y col. (1957). Los distintos pasos se hallan descritos en la tabla 5.

La automatización de la reacción de Zimmermann la hemos realizado basándonos en el sistema de flujo continuo descrito por Zak y col. (1965) pero utilizando etanol 95 por ciento de calidad espectrofotométrica en lugar de metanol para disolver los extractos urinarios y la modificación de Epstein, E. (1962) consis-

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO UTILIZADO

Filtrar 5 ml. de la orina de 24 h.

METODO 17-KS

- Añadir 1 ml. CLH conc. y 0,5 ml. aldehído fórmico
- Hidrolis 10' a 100 °C
- Enfriar y extraer con 10 ml. CH_2Cl_2 10' en agitador rotativo a 33 r.p.m.
- Separar fase acuosa por aspiración y lavar 1 v. con 3 ml. de agua, 1 v. con 3 ml. NaOH 3N y 3 v. con 3 ml. de agua.

METODO T-17-OHS

- Ajustar Ph a 7 con ac. acético al 25 por ciento. Añadir 1 gota alcohol octílico y 0,5 ml. de la sol. de borhidruro potásico
- Poner en BM a 50-60 °C 45' en la oscuridad.
- Añadir 0,5 ml. ac. acético, 25 por ciento y dejar 15' en tem. ambiente.
- Añadir 2 ml. sol. metaperiodato ajustar Ph a 6-7 y poner en BM a 37 °C durante 60'.
- Enfriar, añadir 0,5 ml. NaOH 5N y extraer con 10 ml. Cl_2CH_2 10' en agitador rotativo a 33 r.p.m.
- Separar fase acuosa por aspiración y lavar 3 v. con 3 ml. de agua.
- Separar fase acuosa por aspiración y transferir el Cl_2CH_2 a tubo limpio para colorimetría y evaporar a sequedad (50 °C).

TABLA 4.- Descripción diagramática del método previo para valorar los 17-KS y T-17-OHS.

R. ZIMMERMANN

<u>Método Automatizado</u>	<u>Método Manual</u>
- Disolver residuo en 1 ml. etanol y transferir a copa del autoanalizador.	- Disolver residuo en 0,2 ml. etanol, 0,2 ml. m-BTA. <u>Man</u> tener en la oscuridad 90' a 25°C.
	- Diluir con 2 ml. de etanol al 50 por ciento, extraer con 2 ml. de Cl_2CH_2 , transferir a cubeta de colorímetro y leer a 520 milimicras.

TABLA 5.- Reacción de Zimmerman para la valoración de los 17-KS por el método manual y semiautomatizado.

tente en incluir Hiamina-1622 para solubilizar los esteroides y el m-dinitrobenceno en medio acuoso.

El extracto esteroide, disuelto en un ml. de etanol 95 por ciento, es aspirado, fraccionado mediante burbujas de aire y mezclado con el reactivo H-1622, 2,5 por ciento + 0,2 por ciento de m-DNB en agua. Esta solución es mezclada con el reactivo KOH 4,5 N antes de pasar a través del baño de reacción a 50°C, en cuyo recorrido invierte alrededor de 8 minutos. A continuación la solución es desburbujada mediante un debulador tipo C 5 y se hace pasar a través de la cubeta del colorímetro. La lectura se hace a 520 milimicras.

Al principio los reactivos son colocados en sus respectivas líneas de flujo, se pone en funcionamiento la bomba y se dejan correr unos 30 min. para que se equilibre el sistema. A continuación en nuestro laboratorio acostumbramos a correr una muestra continua de 80 mcg (ml de DHEA para equilibrar mejor el sistema y lograr una línea de base estable. En cada serie ponemos una orina control, de nuestro control de calidad interno y dos patrones de DHEA de 50 mcg/ml. cada 8 o 10 muestras y dos copas con etanol 95 por ciento para comprobar la línea base. Al final lavamos el sistema con agua destilada y dejamos correr aire a continuación hasta vaciarlo completamente.

III.2.- ANALISIS DE LOS VALORES DE CORTISOL PLASMATICO (11-OH-CS) EN
UNA POBLACION "CONTROL" HOSPITALARIA.

III.2.1 Diseño experimental.-

Se analizaron 611 muestras de plasma tomadas a las 9 h. de la mañana de sujetos que acudian a los servicios hospitalarios, de ambos sexos y de edades comprendidas entre los 2 y 72 años, no sospechosos de padecer endocrinopatía, metabolopatía o nefropatía alguna y no estando sometidos a terapéutica con corticoides.

Se realizaron 149 pruebas de estimulación con 0,25 mgs. de tetracosactido sintético (Nuvacthen) determinándose la cifra de 11-OH-CS antes y a los 60' de la inyección.

Se analizaron los valores de 11-OH-CS a las 20 horas comparandolos con los correspondientes basales para estudiar el ritmo de secreción en 145 casos.

En 70 casos se determinaron las concentraciones de los 11-OH-CS a las 9 de la mañana del día siguiente después de haber ingerido a las 23 h., 1 mgr de dexametasona (prueba de Nugent).

III.2.2. Métodos de Laboratorio.-

Todas las muestras fueron analizadas por el método fluorimétrico de Matingly, determinando los 11-OH-CS totales. Este método se describió anteriormente. (III.1.3).

En algunos casos se recogieron orinas de 24 horas

para la determinación de los 17-cetosteroides y de los 17-hidroxiesteroides cetogénicos totales por el método de APPLEBY modificado y semiautomatizado (descrito en III.1.3).

III. 3. CUANTIFICACION DE CORTISOL LIBRE URINARIO

III.3.1. Reactivos.-

Todos los solventes (Merk, reactivo análisis), fueron utilizados sin purificación previa. Cortisol 1, 2,4, 6- H^3 (F- H^3) con actividad específica de 120 ci/mol fue obtenido de Radiochemical Center, Amersham, Inglaterra. Su pureza, comprobada mediante cromatografía en capa fina (tolueno: etanol 85:15), fue de 97,5 % y fue utilizado sin purificación previa. Los esteroides no radioactivos utilizados: cortisol, cortisona, progesterona, 17- hidroxiprogesterona, 11-deoxicortisol, corticosterona y deoxicorticosterona, fueron obtenidos de Ikhafarm.

Carbón activado (Aktiwhole), $PO_4HNa_2 \cdot 2H_2O$ y PO_4H_2K fueron obtenidos de Merck. Dextran-70, fue obtenido de Pharmacia. PPO (2,5-Diphenyloxazole) y Dimethyl-POPOP (p-bis (2(4 methyl-5-phenyloxazolyl))-benzene), fueron obtenidos de Amersham-Searle.

III.3.3. Soluciones.-

Tampon fosfato, pH 7,5. Fue preparado añadiendo

13,1 ml. de una solución 0,5 M de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ a 66,9 ml. de una solución 0,5 M de PO_4HNa_2 y diluyendo hasta un volumen final de 1000 ml. con agua destilada.

Suspensión de carbón-Dextraño. La suspensión de carbon (0,5 %) - dextraño (0,05 %) en tampón fosfato, es mantenida a 2-4 °C en agitación continua (agitador magnético) durante al menos 60 minutos antes de su uso.

Mezcla para centelleo líquido.- 4,0 grs de PPO y 0,2 grs de dimethyl-POPOP, diluidos en 1000 ml. de tolueno.

Solución $\text{CBG-H}^3\text{-F}$. La fuente de CBG es plasma de un paciente ovariectomizada tratada crónicamente con estrógenos y tres días (previamente a la obtención del plasma) con dexametasona. El plasma, diluido en glicerol v/v y conservado a -20 °C hasta el momento de su uso, es utilizado a una dilución de 0,2 % en tampón fosfato conteniendo aproximadamente 60.000 dpm de $\text{F-H}^3/\text{ml}$. ($\text{CBG-H}^3\text{-F}$). Dicha solución, conservada a 4°C puede ser en general utilizada sin pérdida sensible de actividad durante al menos dos semanas.

III.3.3. Proceso de análisis.-

a) Plasma: La tabla 6 muestra el procedimiento seguido para la extracción y cuantificación de corticosteroides en plasma. A 0,1 ml. de plasma se añade 0,5 ml. de agua destilada y 1000 dpm aproximadamente de F-H^3 para corrección final de las posibles pérdidas duran-

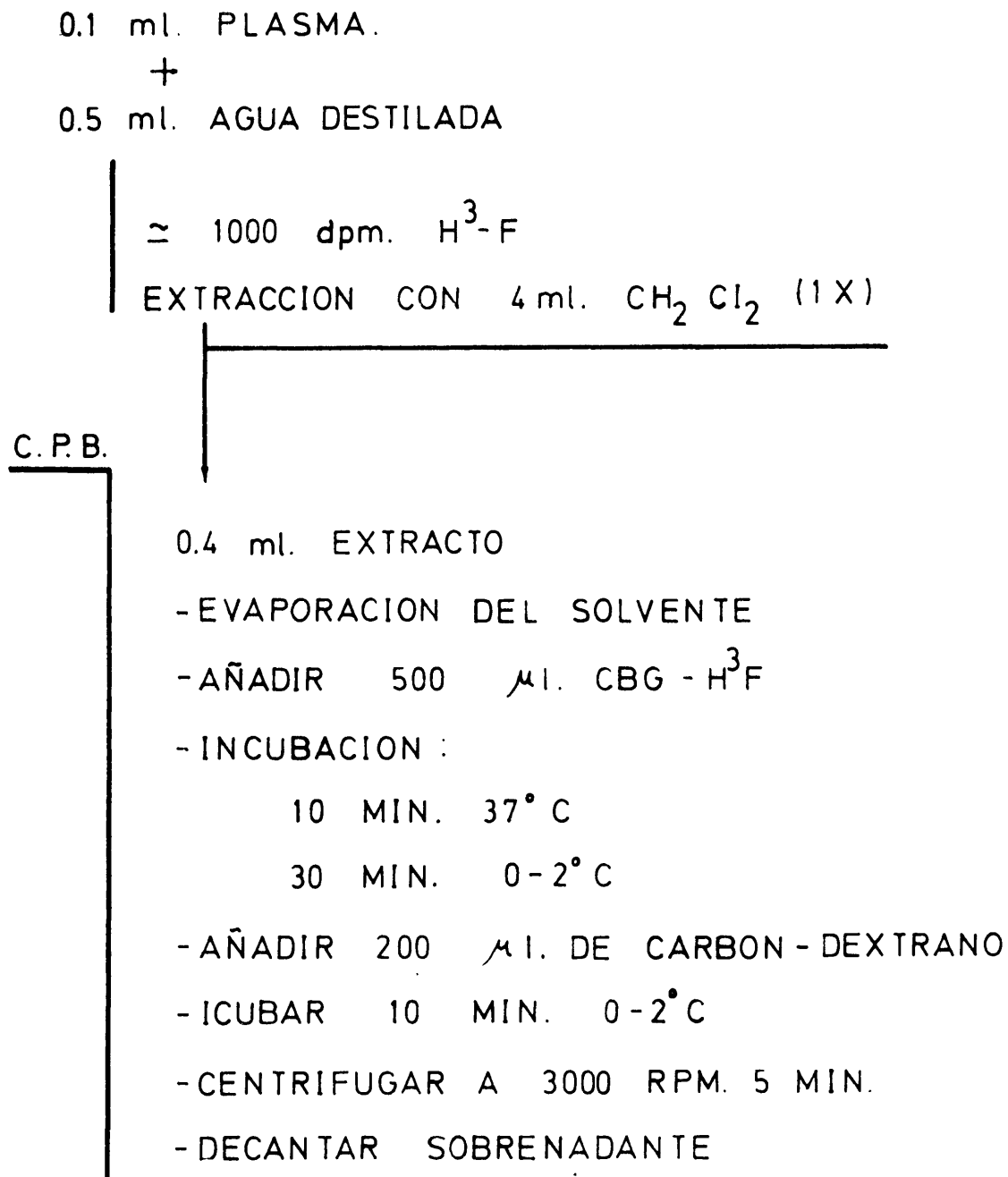


TABLA 6.- Descripción diagramatica del método para dosificar cortisol por C.P.B. en plasma.

te el proceso de extracción con 4,0 ml. de diclorometano (extracción realizada mediante rotación mecánica a 30 r.p.m. durante 10 minutos, en tubos de vidrio adecuados).

Para la realización del análisis cuantitativo por CPB, se toman por duplicado, alícuotas de 1/10 del extracto que se evaporan a sequedad bajo corriente de aire a 37°C. Una curva standard se prepara añadiendo a una serie de tubos de vidrio de 10 x 75 mm. en duplicado, los volúmenes adecuados en cada caso de soluciones de cortisol en etanol de 10 y 80 mg (ml. para obtener 0, 0,25, 0,50, 1, 2,0, 4,0 y 8,0 ng/tubo, y el solvente, evaporado bajo corriente de aire a 37°C. Se añade a cada uno de los tubos (curva standard y muestras problema) 0,5 ml. de la solución CBG-H³-F y, después de agitar en el vortex por unos segundos, se incuban durante 10 minutos a 37°C y luego por 30 minutos adicionales a 2 - 4°C. La separación de las fracciones de cortisol libre y ligado a CBG se consigue añadiendo 0,2 ml/tubo de la suspensión de carbon-dextrano (excepto a dos tubos, preservados para determinar con exactitud la actividad total de F-H³ añadida, a los cuales se les añade 0,2 ml. de tampón fosfato) y, tras agitar en el vortex unos segundos se mantienen 10 minutos a 2-4°C para centrifugar a continuación durante 5 minutos a 3000 r.p.m. mante-

niendo la temperatura por debajo de 4 °C durante el proceso. El sobrenadante, que contiene la fracción de esteroides ligada, se decanta en viales de centelleo que contienen 1,0 ml. de dioxano. Se añaden después a cada uno de los viales 10 ml. de dioxano. Se añaden después a cada uno de los viales 10 ml. de la mezcla de centelleo, se agitan y se determina la radiactividad presente en un espectrómetro de centelleo líquido acumulando un número de cuentas para cada muestra suficientes para que el error de conteo sea inferior a 1,0 %. Este procedimiento permite extraer el esteroide de la fase acuosa inicial con la mezcla de centelleo (tolueno) y la radiactividad puede de este modo ser medida con una eficiencia de conteo para H^3 superior al 40 %. Es, por otra parte, más económico que la utilización de soluciones de centelleo adecuadas para muestras acuosas.

La cantidad de "cortisol" presente en cada una de las muestras problema, se determina sobre la curva standard construida utilizando la relación U/U_0 (fracción de $F-H^3$ ligado (U)/fracción de $F-H^3$ ligado en el punto 0 (U_0), frente a los correspondientes standards utilizados (Fig. 9).

- b) Orina : A 0,5 - 1,0 ml. de orina (o bien una alicuota 1/1500 - 1/2000 de la diuresis de 24 horas), se añaden 2000 dpm de $F-H^3$ y se extraen con 7 volúmenes de

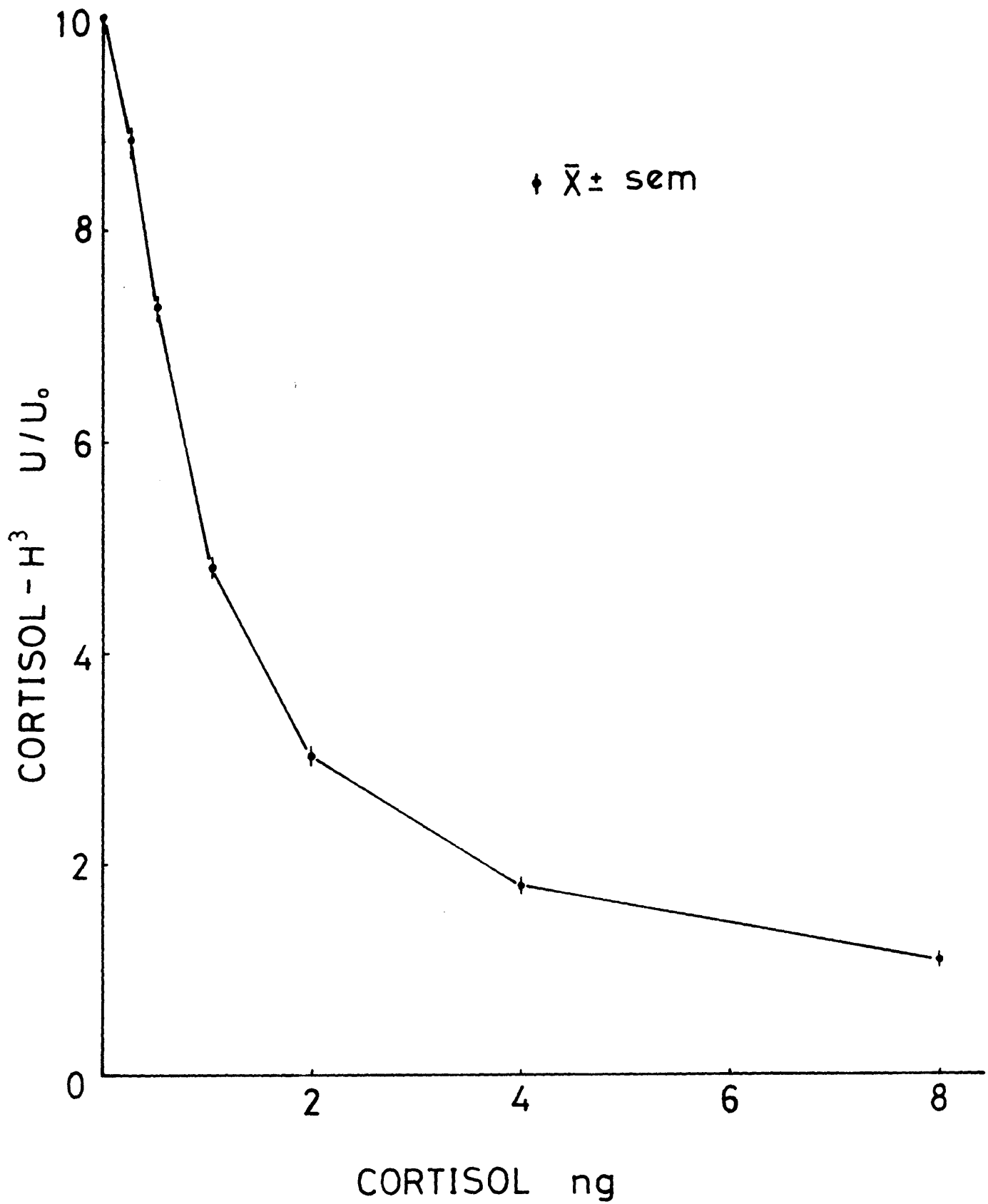


FIG. 9.- Curva standard obtenida midiendo el desplazamiento de F-H³ con cantidades conocidas de cortisol frio.

diclorometano. Una vez retirada la fase superior, acuosa, el solvente es lavado sucesivamente con 0,5 - 1,0 ml. de NaOH 0,1 N y 1,0 ml. de agua destilada. La confección de la curva standard y el análisis de las muestras es igual a lo descrito en el apartado anterior para las muestras de plasma. Una alicuota del extracto final es directamente pipeteada en viales de centelleo, el solvente evaporado a sequedad y su radiactividad determinada para corrección de las pérdidas habidas en el proceso de extracción.

La corrección para "quenching" fue realizada mediante relación de canales para el standard externo.

III.4. METODOS ESTADISTICOS

III.4.1. Estadística paramétrica.-

Se emplearon los métodos clásicos que no describimos por considerarlo innecesario y que resumiendo fueron:

1º- Test de ajuste: Se empleó preferentemente el método

χ^2 como test de ajuste a una población normal, en determinadas ocasiones empleamos también el método de Kolmogorov-Smirnov que describiremos completo más adelante.

2º- Prueba "t" de Student: Ha sido el test más utilizado para comparación de medias, estudiando directamente las muestras o cuando fue posible evaluando las diferencias frente a cero, tomando el sujeto como propio control, evitando así la variabilidad individual.

3°.- Test F de Fisher: Esta prueba se ha aplicado de dos formas: a) como paso previo antes de aplicar la "t" de Student para demostrar que las variaciones de las distintas muestras podrían considerarse estadísticamente iguales, es decir, que provenían de una misma población normal.- b) al efectuar el análisis de varian-za para un sistema de bloques aleatorizados con dos factores, la variación en la prueba de respuesta adre-nal con el octadecapéptido para distintas vías de ad-ministración y distintas dosis.

4°.- Estudio de la correlación y cálculo de rectas de re-gresión (estadística de dos variables).

5°.- Método de Kolmogorov-Smirnov: Sea $F(x)$ la función de distribución de X , que sospechamos continua y sea (x_1, x_2, \dots, x_n) una muestra aleatoria simple y $F_n(x)$ la distribución empírica de esta muestra.

$$\text{Denominando } D_n = \sup \left| F_n(x) - F(x) \right|$$

se define una nueva función (de Kolmogorov) $K_n(z)$

como límite de la expresión $O_n(z) = \Pr\{\sqrt{n} D_n < z\}$

cuando n

$$K(z) = \lim_{n \rightarrow \infty} O_n(z)$$

esta función $K(z)$ se encuentra tabulada en la tabla del apéndice.

Utilización del método .- Se fija el nivel de signifi-cación y hecha la hipótesis de que la distribución bá-sica es $K(x)$. En la tabla II estadística, buscamos

que valor z corresponde tal que $K(z) = \alpha$ y que verifica:

$$P\left\{\sqrt{n} D_n < Z\right\} = K(z) = \alpha$$

entonces si $D_n < \frac{z}{\sqrt{n}}$ se acepta la hipótesis al nivel de significación α , y si no se rechaza.

La forma de proceder aparece esquematizada en la tabla 7. En la columna (1) se anotan las frecuencias acumuladas relativas de los extremos derechos de las clases. En la columna (2) se escriben los valores de la función de distribución acumulada teórica (en el ejemplo, los valores de la función de distribución normal acumulada, $F(z_i)$ para los extremos derechos de las clases. Los extremos tipificados se han obtenido en la columna (3) de la Tabla 7. Finalmente, en la columna (3), se calculan los módulos de las diferencias de los valores correspondientes de las columnas (1) y (2).

El máximo de las diferencias en valor absoluto, que en el ejemplo es 0,0271, se compara con el valor crítico de D dado en la Tabla II estadística, para el tamaño de muestra correspondiente y el nivel de significación elegido. En el ejemplo, $n = 150$ y $\alpha = 0,05$. El valor crítico de las tablas es 1,36

$$\frac{1,36}{\sqrt{n}} = \frac{1,36}{\sqrt{150}} = 0,11$$

(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Clases C_i	Intervalos de clase $e_i = e_i - e_{i-1}$	Marcas de clase x_i	Frecuencias f_i	Frecuencias acumuladas F_i	Frecuencias acumuladas relativas F_i/n
C_1	53,225-53,275	53,25	2	2	0,0133
C_2	53,275-53,325	53,30	5	7	0,0466
C_3	53,325-53,375	53,35	8	15	0,1000
C_4	53,375-53,425	53,40	16	31	0,2066
C_5	53,425-53,475	53,45	28	59	0,3933
C_6	53,475-53,525	53,50	37	96	0,6400
C_7	53,525-53,575	53,55	28	124	0,8266
C_8	53,575-53,625	53,60	12	136	0,9066
C_9	53,625-53,675	53,65	9	145	0,9666
C_{10}	53,675-53,725	53,70	4	149	0,9933
C_{11}	53,725-53,775	53,75	1	150	1,0000

(0)	(1)	(2)	(3)
Clases C_i	Frecuencias acumuladas relativas F_i/n	Frecuencias acumuladas relativas esperadas $F_i/n = F_{(i)}$	Diferencias $D_i = F_i/n - F_{(i)}$
C_0	0,0000	0,0023	0,0023
C_1	0,0133	0,0102	0,0031
C_2	0,0466	0,0367	0,0099
C_3	0,1000	0,1038	0,0038
C_4	0,2066	0,2296	0,0230
C_5	0,3933	0,4168	0,0235
C_6	0,6400	0,6255	0,0145
C_7	0,8266	0,7995	0,0271
C_8	0,9066	0,9147	0,0081
C_9	0,9666	0,9706	0,0040
C_{10}	0,9933	0,9922	0,0011
C_{11}	1,0000	0,9984	0,0016
C_{12}	1,0000	1,0000	0,0000

TABLA 7.- Ejemplo de aplicación del método de Kolmogorov de ajuste a una población normal. Tabla superior: distribución de frecuencias de la muestra. Tabla inferior: Calculo de diferencias.

(Tomada de J.A. Viedma. Met. Estad. Ed. del Castillo, Madrid 1972)

Como el máximo calculado 0,0271 es menor que el valor crítico 0,11 se acepta la hipótesis de normalidad con un nivel de confianza del 95 % o lo que es igual con un nivel de significación del 5 %.

III.4.2 Estadística no paramétrica.-

Pasamos a describir los métodos estadísticos no paramétricos o de distribución libre (Free) utilizados en la explotación de los resultados en los distintos experimentos fundamento de esta tesis doctoral. Estos métodos no paramétricos, son en la mayoría de los casos preferibles a los métodos clásicos (paramétricos) para el experimentador biológico y por eso los describimos con detalle en esta tesis, citando sus ventajas e inconvenientes.

a) Calculo del rango de una población

- Descripción método de Wilks
- Problemas de los extremos

b) Comparación de dos muestras

- Willcoxon
- Mann-Witney

a) Métodos para calcular el rango normal de una población:

1.- Métodos paramétricos:

Método PE: Para una distribución gaussiana, de media μ y de desviación standard σ . Los 2,5 y 97,5 percentiles de esta distribución son los valores $\mu - 1,96\sigma$ y $\mu + 1,96\sigma$. Los valores μ y σ se reemplazan por sus estimaciones a partir de la muestra \bar{X} y s , obteniendo

pues como rango normal para el 95 % de la población $\bar{X} \pm 1,96 s$. Naturalmente para aplicar este resultado, la muestra ha de ser suficientemente grande y constatar previamente, mediante un test de ajuste, el caracter gaussiano de la distribución. Este es el denominado método PE.

Método TI: Para $P = 0,95$ y $\gamma = 0,90$. Un 95-90 TI es un par de números L y U, tal que el 95% o más de los valores de la población son mayores que L y menores que U, y esta afirmación es verdadera con una probabilidad del 90%. Un método para calcular TI cuando los datos tienen una distribución gaussiana fue presentado por Wald y Wolfowitz (1946). Determinando una constante K, que depende del tamaño de la muestra n, tal que

$$\Pr \left\{ \int_L^U \frac{1}{\sqrt{2n}\sigma} \exp. \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu}{\sigma} \right)^2 \right] dx \geq p \right\} = \gamma$$

donde $L = \bar{X} - KS$ y $U = \bar{X} + KS$

Las tablas para determinar el valor de K, pueden encontrarse en HENRY, R. J. (1964) para $n > 100$, $P = 0,95$ y para $\gamma = 0,75, 0,90$ y $0,95$. El método TI se llama también "método del factor K".

2.- Métodos no paramétricos:

Método de Wilks: Este autor publicó un método Wilks, S. S. (1941) basado en la distribución binomial. Los n elementos de la muestra se ordenan de menor a mayor x_1, x_2, \dots, x_n y tratamos de hallar el mayor valor

r y el menor $n - s + 1$ tal que

$$\sum_{j=r}^{n-s+1} \binom{n}{j} 0,95^j 0,05^{n-j} \gg \gamma$$

donde γ es la probabilidad de que el 95 % de la población se encuentre en el intervalo hallado. Los valores x_r y x_{n-s+1} son los extremos del rango normal estimado por este método.

Las tablas han sido publicadas en Somerville P. N. (1958) , tabulando $m = r + s$ para valores de $\gamma = 0,5, 0,75, 0,90, 0,95$ y $0,99$, y para un tamaño de la muestra comprendido entre 50 y 1000, cuando el rango normal estimado es del 95 % de la población.

Los valores de r y s se toman iguales si m es par, o se diferencian en 1 si m es impar.

Si $\gamma = 0,9$ y estimamos el 95 % de la población el método se denomina 95 - 90 TI.

Método PE (no paramétrico): Otro procedimiento para estimar el 95 % de la población es el método de percentiles "PE'S Method". También está basado en la ordenación de la muestra de menor a mayor. $x_1 \ x_2 \ \dots \ x_r \ \dots \ x_n$. Se estima el percentil 2,5 de la población a partir del 2,5 percentil de la muestra estudiada. El valor $r - 1$ correspondiente viene dado por $l = 0,025 (n + 1)$ en donde n es el tamaño de la muestra. Si el valor l no es entero, existirá un m tal $m < l < m + 1$ interpolándose el valor correspondiente en el x_m y el

x_{m+1} si estos son distintos. Análogamente aplicado $L = 0,975 (n + 1)$ se obtendría el percentil 97,5.

El método PE nos dá números sencillos como estimadores de los límites normales de la población. También es posible derivar a un intervalo de confianza (estimador de intervalo) para cada límite normal. Un intervalo de confianza es un intervalo continuo que contiene el verdadero valor del extremo del rango normal con una probabilidad especificada, tal como 0,90. Un intervalo de confianza del 90 % para el extremo inferior del rango normal (95 %), se obtiene encontrando los valores de a y b tales que

$$\sum_{j=a}^{b-1} \binom{n}{j} 0,025^j 0,975^{n-j} \gg 0,90$$

En donde a y b son números naturales y (x_a, x_b) comprenden con un 90 % de probabilidad, el verdadero valor correspondiente al 2,5 percentil de la población. La tabla 8 da los valores de a y b para varios valores de n y un nivel de confianza del 90 %. Esta tabla ha sido construida a partir de la tabla de probabilidades de la distribución normal, aproximada por la distribución de POISSON y en algunos casos por la distribución de Gauss con la corrección de continuidad.

T A B L A 8

Intervalo de confianza al 90 % correspondiente al percentil 2,5

Tamaño de la muestra		Rango	
De	a	a	b
120	131	1	7
132	159	1	8
160	187	1	9
188	189	1	10
190	216	2	10
217	246	2	11
247	251	2	12
252	276	3	12
277	307	3	13
308	310	3	14
311	338	4	14
339	366	4	15
367	369	5	15

Si $n < 120$, no es posible obtener los intervalos de confianza al 90 % por el percentil 2,5 y 97,5. Una alternativa es reducir el nivel de confianza por ejemplo, al 70 % como hacemos en la tabla 9, siendo necesario no obstante que $n > 75$.

T A B L A 9

Intervalo de confianza al 70 % correspondiente al percentil 2,5

Tamaño de la muestra		Rango	
De	a	a	b
75	82	1	4
83	111	1	5
112	134	1	6
135	142	2	6
143	173	2	7
174	188	2	8
189	206	3	8

b) Comparación de dos muestras

Muestras relacionadas .- Test de Wilcoxon

El test de rangos debido a Wilcoxon (1945), estudia la diferencia entre dos muestras asociadas por pares, y tiene en cuenta no solo la diferencia de signo sino también sus rangos. La realización de este test, necesita el calculo de las diferencias observadas entre pares de individuos, la determinación del rango de estas diferencias, haciendo abstracción de sus signos y el cálculo de la suma de rangos de las diferencias positivas (Y_+) y la suma de los rangos de las diferencias negativas (Y_-). La suma total debe ser $Y_+ + Y_- = n(n + 1)/2$. Si la hipótesis de identidad es verdadera, los valores obtenidos para cada suma deben fluctuar alrededor de $\frac{n(n+1)}{4}$. El test tiene por principio verificar si el valor realmente observado no es estadísticamente diferente del valor esperado.

Realización práctica.-

- Se determina para cada sujeto la diferencia entre los dos tratamientos.
- Se ordenan estas diferencias en valor absoluto
- Se asigna a cada diferencia un valor, de acuerdo con la ordenación, cuando existan varias diferencias iguales, se promedian los valores correspondientes
- Se añade a cada rango el signo (+ ó -) de la diferencia que representa.

- Se determina T la suma de los rangos de igual signo menor.
- Se determina el número N de diferencias distintas de cero.
- Si $N < 25$ la tabla (III) contiene los valores críticos de T para diferentes valores de N y un nivel de significación determinado.
- Si N es mayor de 25, la suma de los rangos T está prácticamente distribuida de forma normal, estudiándose la variable normal reducida.

$$Z = \frac{T - n(n+1)/4}{\sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}}$$

Prueba de U Mann-Whitney: Supongamos que tenemos muestras de dos poblaciones A y B. La hipótesis de nulidad supondrá que A y B tienen la misma distribución. La hipótesis alterna H_1 , frente a la cual probamos H_0 es que A es estadísticamente mayor que B. Si A' es una observación de la población A y B' es una observación de la población B, H_1 es que $P(a > b) > 1/2$. Podríamos también predecir que B es estadísticamente mayor que A. Entonces H_1 sería que $P(a < b) > 1/2$. La realización práctica de la prueba U la veremos a continuación:

Sea n_1 el número de casos del más pequeño de los grupos independientes y n_2 el número de casos del más grande. Para aplicar la prueba U se empieza por combinar los resultados de ambos grupos ordenándolos algebraicamente (tenien

do en cuenta el signo) de menor a mayor.

A continuación se estudia uno de los grupos, por ejemplo, el grupo con n_1 casos. El valor de U , está dado por el número de veces que en la clasificación, un valor del grupo n_2 casos precede a un valor del grupo con n_1 casos.

La distribución muestral de U conforme a H_0 es conocida y por lo tanto podemos determinar la probabilidad asociada con la ocurrencia conforme a H_0 de cualquier valor de U tan extremo como su valor obtenido.

Con respecto al tamaño de las muestras pueden ocurrir tres casos:

1º.- Muestras muy pequeñas (n_1 y $n_2 < 8$).- Basta buscar el valor observado de U en la tabla (IV) para determinar exactamente la probabilidad asociada con la ocurrencia de H_0 . Las probabilidades dadas en la tabla (IV) son de una cola. Para una prueba de dos colas, el valor de p dado en la tabla debe duplicarse. (n_1 es el número de casos del más pequeño de los grupos, n_2 es mayor y U el valor del estadístico). Si el valor U obtenido no aparece en la tabla, observaremos entonces el $U' = n_1 n_2 - U$.

2º.- n_2 entre 9 y 20: Si n_2 (el tamaño de la mayor de las muestras independientes es $9 < n_2 < 20$. La tabla (IV) no puede utilizarse y usaremos la tabla (V) que cambia los valores críticos de U en los niveles de significación, 0,001, 0,01, 0, 0,25, 0,05 para una prueba de una cola.

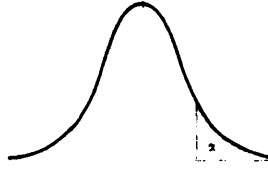
3°.- Muestras grandes ($n_2 > 20$) Mann-Whitney demostraron en 1947 que cuando n_1 y n_2 aumentan de tamaño la distribución muestral U se acerca rápidamente a la distribución normal de media $\mu = \frac{n_1 n_2}{2}$ y desviación standard = $\sigma = \frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}$

estudiándose entonces la variable normal reducida (Tabla I)

$$Z = \frac{U - \mu}{\sigma}$$

CURVA NORMAL TIPIFICADA
TABLA DE AREAS DE LAS «COLAS DERECHAS»
PARA VALORES DE z_1 DE CENTESIMA EN CENTESIMA

$$\int_{z_1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-z^2/2} dz = \alpha$$



z_1	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,5000	0,4960	0,4920	0,4880	0,4840	0,4801	0,4761	0,4721	0,4681	0,4641
0,1	0,4602	0,4562	0,4522	0,4483	0,4443	0,4404	0,4364	0,4325	0,4286	0,4247
0,2	0,4207	0,4168	0,4129	0,4090	0,4052	0,4013	0,3974	0,3936	0,3897	0,3859
0,3	0,3821	0,3783	0,3745	0,3707	0,3669	0,3632	0,3594	0,3557	0,3520	0,3483
0,4	0,3446	0,3409	0,3372	0,3336	0,3300	0,3264	0,3228	0,3192	0,3156	0,3121
0,5	0,3085	0,3050	0,3015	0,2981	0,2946	0,2912	0,2877	0,2843	0,2810	0,2776
0,6	0,2743	0,2709	0,2676	0,2643	0,2611	0,2578	0,2546	0,2514	0,2483	0,2451
0,7	0,2420	0,2389	0,2358	0,2327	0,2296	0,2266	0,2236	0,2206	0,2177	0,2148
0,8	0,2119	0,2090	0,2061	0,2033	0,2005	0,1977	0,1949	0,1922	0,1894	0,1867
0,9	0,1841	0,1814	0,1788	0,1762	0,1736	0,1711	0,1685	0,1660	0,1635	0,1611
1,0	0,1587	0,1562	0,1539	0,1515	0,1492	0,1469	0,1446	0,1423	0,1401	0,1379
1,1	0,1357	0,1335	0,1314	0,1292	0,1271	0,1251	0,1230	0,1210	0,1190	0,1170
1,2	0,1151	0,1131	0,1112	0,1093	0,1075	0,1056	0,1038	0,1020	0,1003	0,0985
1,3	0,0968	0,0951	0,0934	0,0918	0,0901	0,0885	0,0869	0,0853	0,0838	0,0823
1,4	0,0808	0,0793	0,0778	0,0764	0,0749	0,0735	0,0721	0,0708	0,0694	0,0681
1,5	0,0668	0,0655	0,0643	0,0630	0,0618	0,0606	0,0594	0,0582	0,0571	0,0559
1,6	0,0548	0,0537	0,0526	0,0516	0,0505	0,0495	0,0485	0,0475	0,0465	0,0455
1,7	0,0446	0,0436	0,0427	0,0418	0,0409	0,0401	0,0392	0,0384	0,0375	0,0367
1,8	0,0359	0,0351	0,0344	0,0336	0,0329	0,0322	0,0314	0,0307	0,0301	0,0294
1,9	0,0287	0,0281	0,0274	0,0268	0,0262	0,0256	0,0250	0,0244	0,0239	0,0233
2,0	0,0228	0,0222	0,0217	0,0212	0,0207	0,0202	0,0197	0,0192	0,0188	0,0183
2,1	0,0179	0,0174	0,0170	0,0166	0,0162	0,0158	0,0154	0,0150	0,0146	0,0143
2,2	0,0139	0,0136	0,0132	0,0129	0,0125	0,0122	0,0119	0,0116	0,0113	0,0110
2,3	0,0107	0,0104	0,0102	0,00990	0,00964	0,00939	0,00914	0,00889	0,00866	0,00842
2,4	0,00820	0,00798	0,00776	0,00755	0,00734	0,00714	0,00695	0,00676	0,00657	0,00639
2,5	0,00621	0,00604	0,00587	0,00570	0,00554	0,00539	0,00523	0,00508	0,00494	0,00480
2,6	0,00466	0,00453	0,00440	0,00427	0,00415	0,00402	0,00391	0,00379	0,00368	0,00357
2,7	0,00347	0,00336	0,00326	0,00317	0,00307	0,00298	0,00289	0,00280	0,00272	0,00264
2,8	0,00256	0,00248	0,00240	0,00233	0,00226	0,00219	0,00212	0,00205	0,00199	0,00193
2,9	0,00187	0,00181	0,00175	0,00169	0,00164	0,00159	0,00154	0,00149	0,00144	0,00139
z_1	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
3	0,00135	0,0 ³ 968	0,0 ³ 687	0,0 ³ 483	0,0 ³ 337	0,0 ³ 233	0,0 ³ 159	0,0 ³ 108	0,0 ⁴ 723	0,0 ⁴ 481
4	0,0 ⁴ 317	0,0 ⁴ 207	0,0 ⁴ 133	0,0 ⁵ 854	0,0 ⁵ 541	0,0 ⁵ 340	0,0 ⁵ 211	0,0 ⁵ 130	0,0 ⁶ 793	0,0 ⁶ 479
5	0,0 ⁶ 287	0,0 ⁶ 170	0,0 ⁷ 996	0,0 ⁷ 579	0,0 ⁷ 333	0,0 ⁷ 190	0,0 ⁷ 107	0,0 ⁸ 599	0,0 ⁸ 332	0,0 ⁸ 182
6	0,0 ⁹ 987	0,0 ⁹ 530	0,0 ⁹ 282	0,0 ⁹ 149	0,0 ¹⁰ 777	0,0 ¹⁰ 402	0,0 ¹⁰ 206	0,0 ¹⁰ 104	0,0 ¹¹ 523	0,0 ¹¹ 260

PUNTOS CRITICOS DE D EN LA PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV

Tamaño de la muestra (n)	Nivel de significación para $D = \text{máximo} \left F(z_i) - \frac{F_i}{n} \right $				
	0,20	0,15	0,10	0,05	0,01
1	0,900	0,925	0,950	0,975	0,995
2	0,684	0,726	0,776	0,842	0,929
3	0,565	0,597	0,642	0,708	0,828
4	0,494	0,525	0,564	0,624	0,733
5	0,446	0,474	0,510	0,565	0,669
6	0,410	0,436	0,470	0,521	0,618
7	0,381	0,405	0,438	0,486	0,577
8	0,358	0,381	0,411	0,457	0,543
9	0,339	0,360	0,388	0,432	0,514
10	0,322	0,342	0,368	0,410	0,490
11	0,307	0,326	0,352	0,391	0,468
12	0,295	0,313	0,338	0,375	0,450
13	0,284	0,302	0,325	0,361	0,433
14	0,274	0,292	0,314	0,349	0,418
15	0,266	0,283	0,304	0,338	0,404
16	0,258	0,274	0,295	0,328	0,392
17	0,250	0,266	0,286	0,318	0,381
18	0,244	0,259	0,278	0,309	0,371
19	0,237	0,252	0,272	0,301	0,363
20	0,231	0,246	0,264	0,294	0,356
25	0,21	0,22	0,24	0,27	0,32
30	0,19	0,20	0,22	0,24	0,29
35	0,18	0,19	0,21	0,23	0,27
Más de 35	$\frac{1,07}{\sqrt{n}}$	$\frac{1,14}{\sqrt{n}}$	$\frac{1,22}{\sqrt{n}}$	$\frac{1,36}{\sqrt{n}}$	$\frac{1,63}{\sqrt{n}}$

Tabla estadística II.- (Tomada de J. A. Viedma.- Metodos estadísticos.- Ed. del Castillo.- Madrid, 1972).

Tabla de valores críticos de T en la prueba de los rangos señalados de pares igualados de Wilcoxon*

N	Nivel de significación para prueba de una cola		
	.025	.01	.005
	Nivel de significación para prueba de dos colas		
	.05	.02	.01
6	0	—	—
7	2	0	—
8	4	2	0
9	6	3	2
10	8	5	3
11	11	7	5
12	14	10	7
13	17	13	10
14	21	16	13
15	25	20	16
16	30	24	20
17	35	28	23
18	40	33	28
19	46	38	32
20	52	43	38
21	59	49	43
22	66	56	49
23	73	62	55
24	81	69	61
25	89	77	68

Tabla estadística III.- (Tomada de SIDNEY SIEGEL, Estadística no paramétrica. Ed. Trillas, Mexico, 1972.

Tabla de probabilidades asociadas con valores tan pequeños como los valores observados de U en la prueba de Mann-Whitney*

		$n_2 = 3$					$n_2 = 4$			
		n_1					n_1			
		1	2	3			1	2	3	4
U					U					
0		.250	.100	.050	0	.200	.067	.028	.014	
1		.500	.200	.100	1	.400	.133	.057	.029	
2		.750	.400	.200	2	.600	.267	.114	.057	
3			.600	.350	3		.400	.200	.100	
4				.500	4		.600	.314	.171	
5				.650	5			.429	.243	
					6			.571	.343	
					7				.443	
					8				.557	

		$n_2 = 5$							$n_2 = 6$					
		n_1							n_1					
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	6
U							U							
0		.167	.047	.018	.008	.004	0	.143	.036	.012	.005	.002	.001	
1		.333	.095	.036	.016	.008	1	.286	.071	.024	.010	.004	.002	
2		.500	.190	.071	.032	.016	2	.428	.143	.048	.019	.009	.004	
3		.667	.286	.125	.056	.028	3	.571	.214	.083	.033	.015	.008	
4			.429	.196	.095	.048	4		.321	.131	.057	.026	.013	
5			.571	.286	.143	.075	5		.429	.190	.086	.041	.021	
6				.393	.206	.111	6		.571	.274	.129	.063	.032	
7				.500	.278	.155	7			.357	.176	.089	.047	
8				.607	.365	.210	8			.452	.238	.123	.066	
9					.452	.274	9			.548	.305	.165	.090	
10					.548	.345	10				.381	.214	.120	
11						.421	11				.457	.268	.155	
12						.500	12				.545	.331	.197	
13						.579	13					.396	.242	
							14					.465	.294	
							15					.535	.350	
							16						.409	
							17						.469	
							18						.531	

Tabla estadística IV.- Tomada de SIDNEY SIEGEL.- Estadística no paramétrica.- Ed. Trillas, Mexico, 1972.

$n_1 \backslash t$	1	2	3	4	5	6	7
0	125	028	008	003	001	001	000
1	250	056	017	006	003	001	001
2	375	111	033	012	005	002	001
3	500	167	058	021	009	004	002
4	625	250	092	036	015	007	003
5		333	133	055	021	011	006
6		444	192	082	037	017	009
7		556	258	115	053	026	013
8			333	158	074	037	019
9			417	206	101	051	027
10			500	264	134	069	036
11			583	324	172	090	049
12				394	216	117	064
13				464	265	147	082
14				538	319	183	104
15					378	223	130
16					438	267	159
17					500	314	191
18					562	365	228
19						418	267
20						473	310
21						527	355
22							402
23							451
24							500
25							549

$n_1 = 8$

$n_1 \backslash t$	1	2	3	4	5	6	7	8	t	Normal
0	111	022	006	002	001	000	000	000	3.308	001
1	222	044	012	004	002	001	000	000	3.203	001
2	333	089	024	008	003	001	001	000	3.098	001
3	444	133	042	014	005	002	001	001	2.993	001
4	556	200	067	024	009	004	002	001	2.888	002
5		267	097	036	015	006	003	001	2.783	003
6		356	139	055	023	010	005	002	2.678	004
7		444	188	077	033	015	007	003	2.573	005
8		556	248	107	047	021	010	005	2.468	007
9			315	141	064	030	014	007	2.363	009
10			387	184	085	041	020	010	2.258	012
11			461	230	111	054	027	014	2.153	016
12			539	285	142	071	036	019	2.048	020
13				341	177	091	047	025	1.943	026
14				404	217	114	060	032	1.838	033
15				467	262	141	076	041	1.733	041
16				533	311	172	095	052	1.628	052
17					362	207	116	065	1.523	064
18					416	245	140	080	1.418	078
19					472	286	168	097	1.313	094
20					528	331	198	117	1.208	113
21						377	232	139	1.102	135
22						426	268	164	998	159
23						475	306	191	893	185
24						525	347	221	788	215
25							389	253	683	247
26							433	287	578	282
27							478	323	473	318
28							522	360	368	356
29								399	263	396
30								439	158	437
31								480	052	481
32								520		

Valores críticos de U para una prueba de una cola en $\alpha = 0.05$
o para una prueba de dos colas en $\alpha = 0.10$

$n_1 \backslash n_2$	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1											0	0
2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4
3	3	4	5	5	6	7	7	8	9	9	10	11
4	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18
5	9	11	12	13	15	16	18	19	20	22	23	25
6	12	14	16	17	19	21	23	25	26	28	30	32
7	15	17	19	21	24	26	28	30	33	35	37	39
8	18	20	23	26	28	31	33	36	39	41	44	47
9	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54
10	24	27	31	34	37	41	44	48	51	55	58	62
11	27	31	34	38	42	46	50	54	57	61	65	69
12	30	34	38	42	47	51	55	60	64	68	72	77
13	33	37	42	47	51	56	61	65	70	75	80	84
14	36	41	46	51	56	61	66	71	77	82	87	92
15	39	44	50	55	61	66	72	77	83	88	94	100
16	42	48	54	60	65	71	77	83	89	95	101	107
17	45	51	57	64	70	77	83	89	96	102	109	115
18	48	55	61	68	75	82	88	95	102	109	116	123
19	51	58	65	72	80	87	94	101	109	116	123	130
20	54	62	69	77	84	92	100	107	115	123	130	138

TABLA K_{II}. Valores críticos de U para una prueba de una cola en $\alpha = 0.01$
o para una prueba de dos colas en $\alpha = 0.02$

$n_1 \backslash n_2$	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1												
2					0	0	0	0	0	0	1	1
3	1	1	1	2	2	2	3	3	4	4	4	5
4	3	3	4	5	5	6	7	7	8	9	9	10
5	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
6	7	8	9	11	12	13	15	16	18	19	20	22
7	9	11	12	14	16	17	19	21	23	24	26	28
8	11	13	15	17	20	22	24	26	28	30	32	34
9	14	16	18	21	23	26	28	31	33	36	38	40
10	16	19	22	24	27	30	33	36	38	41	44	47
11	18	22	25	28	31	34	37	41	44	47	50	53
12	21	24	28	31	35	38	42	46	49	53	56	60
13	23	27	31	35	39	43	47	51	55	59	63	67
14	26	30	34	38	43	47	51	56	60	65	69	73
15	28	33	37	42	47	51	56	61	66	70	75	80
16	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	82	87
17	33	38	44	49	55	60	66	71	77	82	88	93
18	36	41	47	53	59	65	70	76	82	88	94	100
19	38	44	50	56	63	69	75	82	88	94	101	107
20	40	47	53	60	67	73	80	87	93	100	107	114

Tabla Estadística V.- (Tomada de SIDNEY SIEGEL.- Estadística no paramétrica.- Ed. Trillas, Mexico, 1972).

IV. RESULTADOS

IV.1. ESTUDIOS SOBRE LA VALORACION CLINICA DE LA CINETICA DE LA RESPUESTA A UN OCTODECAPEPTIDO DE SINTESIS

IV.1.1. Niveles basales de la población experimental utilizada

En la tabla 10 se recogen los valores obtenidos a las 8 A. M. de los sujetos estudiados en condiciones basales, puede observarse la variabilidad de cada sujeto, así como, la variación de todo el grupo en cada prueba. Observese como los coeficientes de variación de cada sujeto (filas) así como del conjunto de éstos, en diversos días (columnas), son de una magnitud semejante. Hay que hacer notar que las columnas no se refieren a días sucesivos, sino a días distintos, ya que el intervalo de tiempo de una determinación a otra para un mismo sujeto, fue como mínimo de seis días.

IV.1.2. Respuesta máxima al β^{1-24} -ACTH

La respuesta a la administración de 0,25 mgs. y 1 mgs. del tetracosáctido (NUVACTHEN) por vía intravenosa pueden verse en las Tablas 11 y 12. La figura 10 demuestra que no se obtienen diferencias significativas en ninguno de los puntos estudiados (30, 60, 120 y 240 minutos) por alcanzar ya la dosis de 0,25 mgs. del tetracosáctido una respuesta adrenal máxima. Los resultados obtenidos al administrar 0,25 mgs. por dos distintas vías (intravenosa e intramuscular) se muestran en las tablas 11 y 13. En

la figura 11 se pone de manifiesto que no existen diferencias entre ambas vías a los 30, 60 y 120 minutos, pero si a los 240 minutos, donde esta diferencia es altamente significativa ($p < 0,01$), según se deduce de los datos de la tabla 14.

IV.1.3. Respuesta comparativa entre β^{1-24} -ACTH y D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{1-18} -ACTH

La estructura del octodecapéptido (C-41795-Ba) y su diferencia con el tetracosáctido (NUVACTHEN) se muestran en la figura 12.

Inyectamos 1 mgs. de ambos productos por vía intravenosa, los resultados están expresados en las tablas 12 y 15. En la figura 13, puede observarse que si bien durante las dos primeras horas no hay diferencia entre ambos, a partir de este momento las concentraciones de 11-OH-CS conseguidas con la inyección de 1 mgs. intravenoso del β^{1-24} -ACTH son decrecientes, mientras que las conseguidas con el D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{1-18} -ACTH son crecientes, siendo en todos los puntos estudiados (4 horas, 8 horas) las diferencias altamente significativas. Es claro que el estímulo de 1 mgs. intravenoso del β^{1-24} -ACTH no consigue una concentración máxima de los 11-OH-CS plasmáticos, aunque al ser una magnitud no fisiológica, sino farmacológica, la respuesta adrenal debería ser máxima. Este hecho aparentemente paradójico, lo analizaremos con detalle en la discusión.

IV.1.4. Efecto de las vías de administración del D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸
- β^{I-18} -ACTH sobre la cinética del cortisol plasmático

Las respuestas a la administración de 1 mgs. del D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{I-18} -ACTH por las tres vías se encuentran en las tablas 15, 16 y 17. En la figura 14 puede observarse como los valores máximos de cortisol plasmático se obtienen por vía intravenosa. De todas formas quisimos confirmar esta observación mediante el análisis de varianza (Test de Fisher) de un sistema de bloques. Teniendo en cuenta que cada valor tiene una dependencia con respecto al sujeto a que pertenece y al valor que le precede y que, asimismo, condiciona en cierta medida el siguiente, debemos analizar con mayor rigor la significación de las diferencias entre grupos, cuando ya un análisis simple mediante la "t" de Student, nos indicaba que los valores a las 12 h. y a las 24 h. eran distintos, en el caso de la administración endovenosa. El resumen de éste análisis de varianza se encuentra en la tabla 18, donde podemos observar que la variación entre vías de administración es significativamente distinta de la variación residual o error de muestreo, es decir, la distinta vía de administración introduce una diferencia, que no nos permite aceptar la hipótesis (con un coeficiente de riesgo $p < 0,01$) de estar en presencia de distintas muestras de la misma población.

IV.1.5. Efecto de dosis decrecientes del D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β ¹⁻¹⁸-ACTH sobre la cinética del cortisol plasmático.

La respuesta del cortisol plasmático a la administración por vía intramuscular de distintas dosis del octadecapéptido (0,125, 0,250, 0,500 y 1 mgr.), se encuentran en las tablas 19, 20, 21, 16. En la figura 15, puede observarse que la disminución de la dosis administrada por vía intramuscular, no disminuye significativamente los valores de cortisol plásmatico alcanzados a las dos horas de la administración, pero si, la duración de las respuestas. El análisis estadístico de estos grupos (Test U de Mann-Whitney) dá una significación estadística entre los resultados hallados con dosis de 0,125 o 0,500, así como 0,25 y mgr. del octodecapéptido, el resumen de este estudio estadístico puede observarse en la tabla 22.

IV.1.6. Medida de las respuestas adrenales por la excrección urinaria de los 17 KS y 17-OH-CS

En las tablas 23 y 24 se encuentran recogidas los 17-OH-CS totales y 17-KS urinarios de los sujetos a los que se administró 0,25 mgr. y 1 mgr. del tetracosáctido (β ¹⁻²⁴-ACTH) por vía intravenosa. No existen diferencias significativas entre los valores correspondientes a los tres días estudiados (basal, día de la administración y día siguiente a la administración), este hecho queda me-

por reflejado en la figura 16, la gráfica superior son los valores de los 11-OH-CS plasmáticos correspondientes a la inyección de 0,25 mgr. del tetracosáctido por vía endovenosa, en la parte inferior se observan los 17-KS y 17-OH-CS urinarios correspondientes sin diferencias significativas en los tres días.

Las tablas 25, 26 y 27, recogen los valores de los 17-KS y 17-OH-CS (totales) urinarios correspondientes a la inyección de 1 mgr. de C-41795-Ba por las tres vías (intravenosa, intramuscular y subcutánea). En la figura 17 puede observarse como existen diferencias altamente significativas entre los valores basales y los correspondientes al día de la administración para las tres vías. El día siguiente al de la administración los valores correspondientes a la vía intravenosa, continuaban siendo estadísticamente mayores que los correspondientes basales, no ocurriendo lo mismo para las otras dos vías (intramuscular y subcutánea). Los valores de los 17-KS pueden seguir una fluctuación en paralelo pero las diferencias encontradas no son significativas (participación de la función gonadal).

IV.1.7. Correlación entre valores basales de 11-OH-CS plasmáticos y de 17-OH-CS (totales) urinarios

Disponiendo de 57 valores basales tanto de 11-OH-CS plasmáticos a las 9 A.M. como de los 17-OH-CS en la orina

de 24 horas, correspondientes al mismo día (tabla 28), hemos estudiado la correlación entre ambos grupos, suponiendo poblaciones distribuidas normalmente, representando en abscisas (X) los 11-OH-CS plasmáticos en $\mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$ y en ordenadas (Y) los 17-OH-CS (totales) urinarios en $\text{mgr}/24$ horas, obteniendo una recta de mínimos cuadrados:

$$Y = 0,11X + 12,053$$

con un coeficiente de correlación $r = 0,017$, que no es distinto de cero (estadísticamente).

No existe pues correlación entre ambas variables.

IV.1.8. Correlación entre la secreción adrenal y los 17-OH-CS (Totales) urinarios

Siendo el área bajo la curva que reparte las concentraciones de los 11-OH-CS plasmáticos, una medida aproximada de la secreción adrenal, hemos intentado un nuevo estudio bidimensional entre estas áreas, calculados como expresamos a continuación y los valores de los 17-OH-CS (totales) urinarios, los valores que intentamos correlacionar se encuentran en la tabla 29 en donde:

$$S = -23 y_0 + 2 y_1 + 3 y_2 + 4 y_3 + 8 y_4 + 6 y_5,$$

siendo:

y_0	concentración basal a los 11-OH-CS plasmáticos
y_1	" a las 2 h. " " "
y_2	" " " 4 h. " " "
y_3	" " " 8 h. " " "
y_4	" " " 12 h. " " "
y_5	" " " 24 h. " " "

se ha representado en el eje de ordenadas (Y) en $\mu\text{gr}/100 \text{ ml} \times \text{hora}$ y sobre el eje de abcisas (X) los 17-OH-CS (totales) urinarios en $\text{mgr}/24 \text{ horas}$.

Obteniéndose una recta de mínimos cuadrados de ecuación $Y = 7,311 X + 77,026$ con un coeficiente de correlación $r = 0,566$ distinto de cero a $p < 0,01$. Existiendo pues una correlación positiva entre ambas series.

La representación de la recta de regresión obtenida puede sbservarse en la figura 18.

**11-OH-CS BASALES $\mu\text{gr}\%$ ml.
DIAS**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	\bar{X}	D.S.	C.V.
1	F.R.A.	17	15	10	18						15,0	3,56	24
2	M.A.S.	30	31	30	26	27	23				27,8	3,06	11
3	I.S.A.	16	17	17	15						16,2	0,96	6
4	J.B.M.	14	18	11	20	20	20				17,1	3,82	22
5	F.D.N.	13	15	23	19	20	24	15	15	14	17,5	4,07	23,2
6	C.R.R.	7	10	17	11	8	16				11,5	4,14	36
7	G.N.L.	31	29	14	16	18	14				20,3	7,66	37,7
8	R.M.E.	19	14	21	20	20	22				19,3	2,80	14,5
9	S.N.Z.	25	21	14	28	18	23				21,5	5,01	23,3
10	F.R.E.	11	11	21	12	17	14				14,3	4,98	27,7
11	N.V.O.	10	21	22	22	20	24				19,8	5,00	25,2
12	M.A.C.	15	21	18	15						17,2	2,87	16,6
13	M.S.R.							20	16	20			
14	J.M.P.							19	18	21			
15	L.J.N.							22	21	16			
16	J.A.R.							17	19	21			
17	V.M.T.							21	17	15			
	\bar{X}	17,3	18,5	18,1	18,5	18,6	20	19	17,6	17,9			
	D.S.	7,7	6,4	5,6	5,1	4,93	4,21	2,6	2,16	3,19			
	C.V.	44	34	30,9	27,5	26,5	21	13,7	12,2	18			

TABLA 10

	BASAL		30'		60'		120'		240'		
	Mg/100	%	Mg/100	%	Mg/100	%	Mg/100	%	Mg/100	%	
1 F.R.A.	17	100	36	211	41	241	32	188	26	152	24
2 I.S.A.	16	100	39	243	40	250	41	256	37	231	24
3 M.A.S.	30	100	41	136	45	150	45	150	35	116	15
4 J.B.M.	14	100	31	221	33	235	36	257	26	185	19
5 F.D.N.	13	100	40	307	48	369	44	338	29	223	35
6 C.R.R.	7	100	31	442	35	500	29	414	23	328	28
7 G.N.L.	31	100	37	119	41	132	43	138	21	67	10
8 R.M.E.	19	100	32	168	36	189	36	189	20	105	17
9 S.N.Z.	25	100	38	152	57	228	68	272	35	140	32
10 F.R.E.	11	100	25	227	31	281	35	318	17	154	20
11 N.V.O.	10	100	18	180	25	250	28	280	19	190	15
12 M.A.C.	15	100	36	240	39	260	30	200	21	140	24
\bar{x}	17.3		33.7	221	39.3	257	38.9	242	25.8	169	22
σ	± 7.7		± 6.6	± 87	± 8.2	± 96	± 10.8	± 105	± 7.4	± 70	7.0
sem	2.31		1.98	26.1	2.46	28.8	3.24	31.5	2.22	21.0	2.10

TABLA 11.- Valores obtenidos tras la administración de 0,25 mgr. de NUVACTHEN por vía endovenosa.

	BASAL		30'		60'		120'		240'		480'	
	$\mu\text{g}/3100$	%	$\mu\text{g}\%$	%	$\mu\text{g}\%$	%	$\mu\text{g}\%$	%	$\mu\text{g}\%$	%	$\mu\text{g}\%$	%
F.D.N.	20	100	32	160	37	185	40	200	25	125	7	35
C.R.R.	8	"	23	287	29	362	32	400	29	362	6	75
F.R.E.	17	"	26	152	32	188	36	211	32	188	6	35
J.B.M.	20	"	28	140	34	170	37	185	22	110	9	45
S.N.Z.	18	"	35	194	46	255	63	350	51	283	9	50
G.N.L.	18	"	31	172	39	216	46	255	32	177	6	33
R.M.É.	20	"	28	140	36	180	40	200	31	155	12	60
M.A.S.	27	"	37	137	38	140	41	151	26	96	4	14
N.V.O.	20	"	31	155	31	155	34	170	32	160	6	30
\bar{X}	18.6		30.1	170.7	35.7	205.6	41	235.7	31.1	184	7.2	41.8
σ	4.93		4.37	47.1	5.09	67.5	9.59	84.8	8.28	86.3	2.39	18.0
sem	1.64		1.46	15.7	1.7	22.5	3.2	28.2	2.76	28.7	0.80	6.0
Δ												60
												17
												21
												15
												14
												28
												21
												16
												11
												11

TABLA 12.- Valores obtenidos tras la administración de 1 mgr. de NUVACTHEN por vía endovenosa.

	BASAL		30'		60'		120'		240'		Δ 60'
	μg %	%	μg %	%	μg %	%	μg %	%	μg %	%	
F.D.N.	24	100	30	125	37	154	42	175	25	104	13
C.R.R.	16	"	25	156	30	187	18	112	7	43	14
F.R.E.	14	"	28	200	31	221	25	178	11	78	17
J.B.M.	20	"	31	155	33	165	24	120	11	55	13
S.N.Z.	23	"	39	169	44	191	47	204	22	95	21
G.N.L.	14	"	39	278	40	285	27	192	14	100	26
R.M.E.	22	"	31	140	31	140	26	118	13	59	9
M.A.S.	23	"	35	152	41	178	27	117	10	43	18
N.V.O.	24	"	31	129	31	129	26	108	11	45	7
X	20	"	32.1	167.1	35.3	183.3	29.1	147	13.7	69.1	15.3
σ	4.21	"	4.73	47.2	5.27	47.28	9.23	39.1	5.89	25.4	5.89
s. e. m.	1.4	"	1.58	15.7	1.76	15.7	3.08	13.03	1.96	8.47	1.96

TABLA 13.- Valores obtenidos tras la administración de 0,25 mgr. de NUVACTHEN por vía intramuscular.

a) Valores observados

VIA												
I.V.	26	37	35	26	29	23	21	20	35	17	19	21
I.M.	25	7	11	11	22	14	13	10	11			

b) Ordenación

M	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	M	V	M	V	V
7	10	11	11	11	13	14	17	19	20	21	21	22	23	25	26	26

V	V	V	V
29	35	35	37

c) Calculo de U

$$U = 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 5 + 6 = 11$$

d) Nivel de significación:

$$U_{12,9,0,01} = 21 \quad U_{\text{obs}} < U_{12,9,0,01}$$

diferencia altamente significativa

TABLA 14.- Diferencias encontradas entre los valores de 11-OH-CS a los 240' de la administración de 0,25 mgr de ¹⁻²⁴ corticotrofina por vía intravenosa (V) e intramuscular (M). Prueba de Mann-Witney.

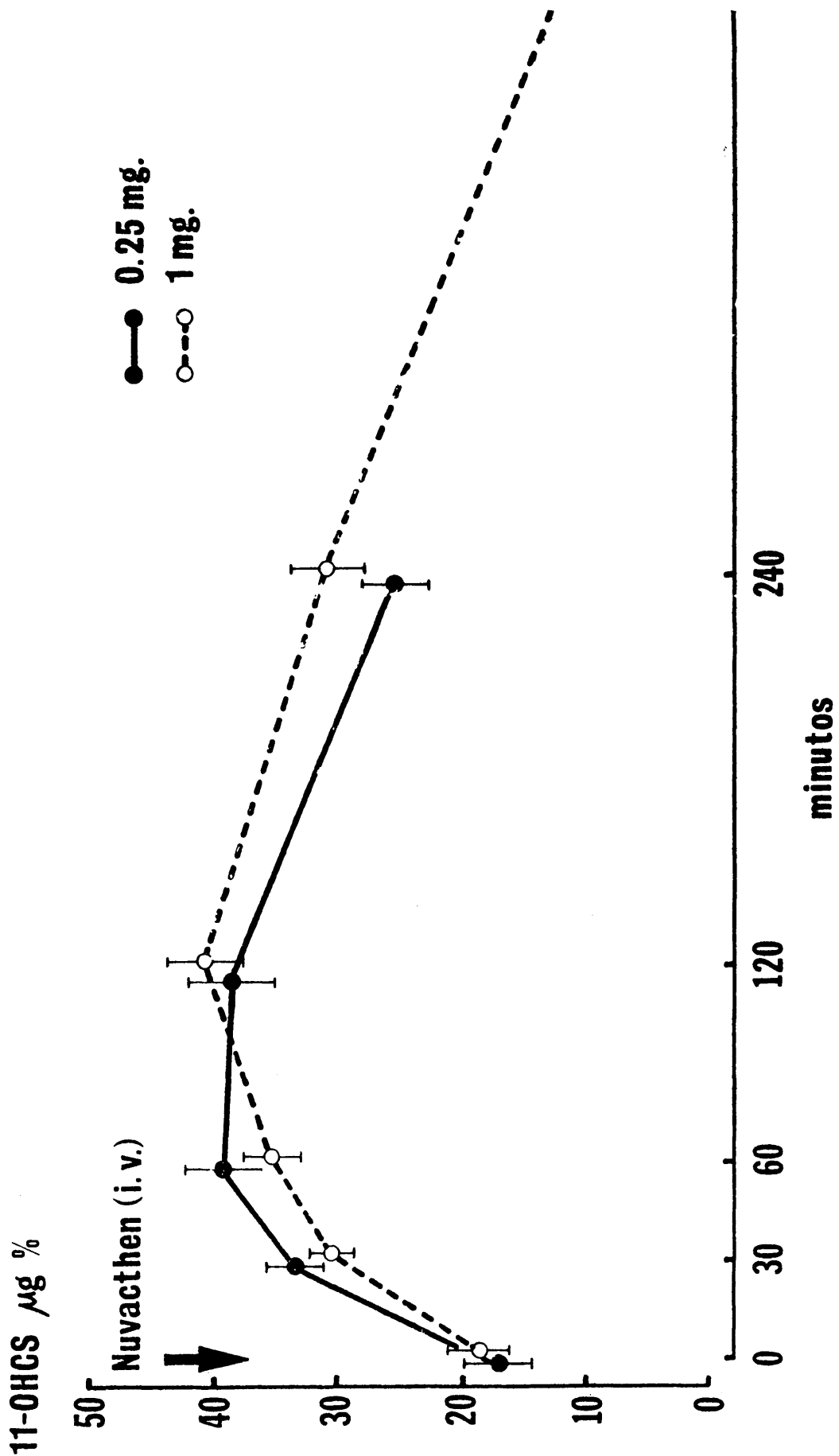


FIG. 10.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos tras la administración de 0,25 y 1 mgr. de NUVACTHEN por vía intravenosa.

11-OHCS

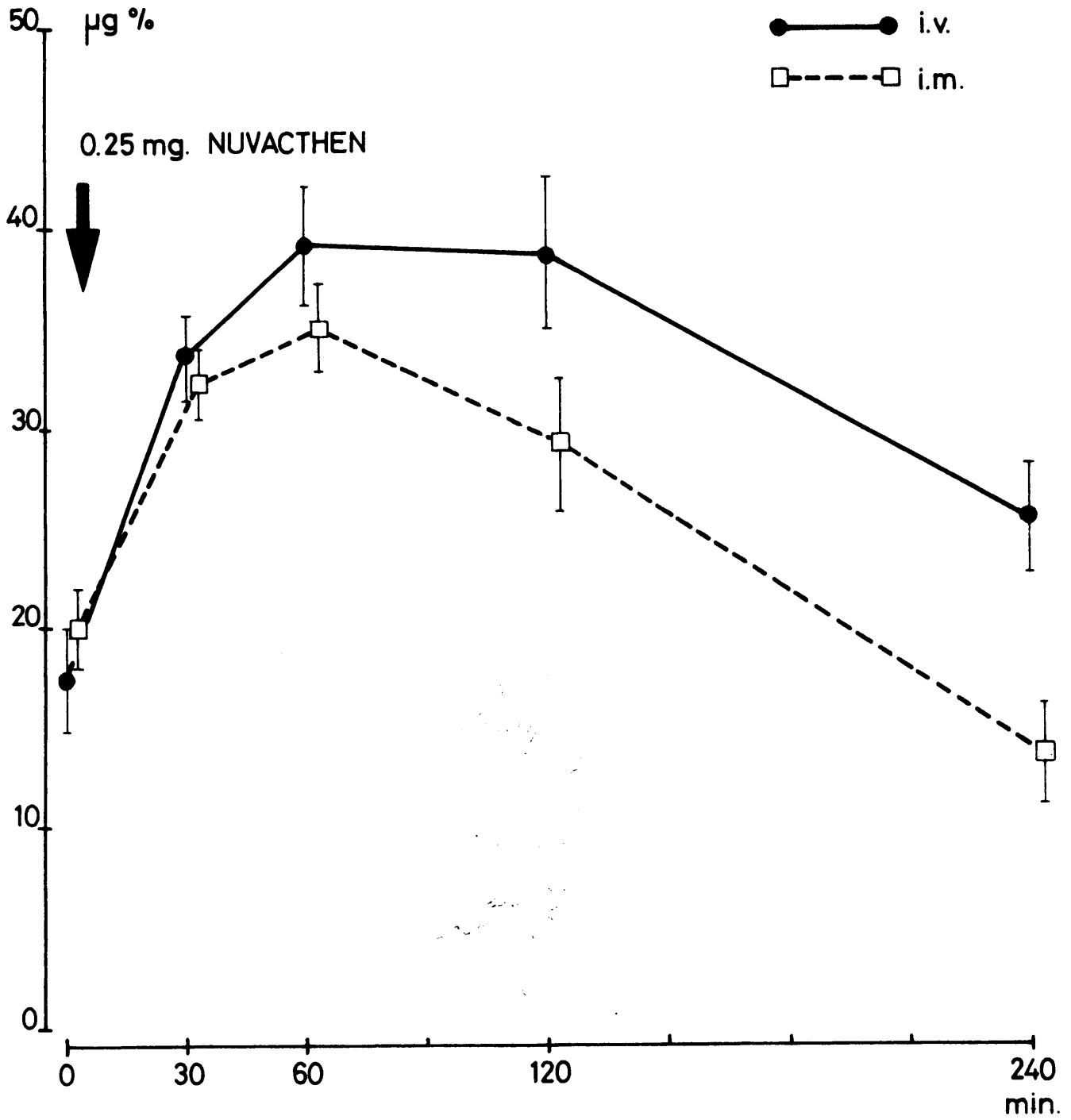
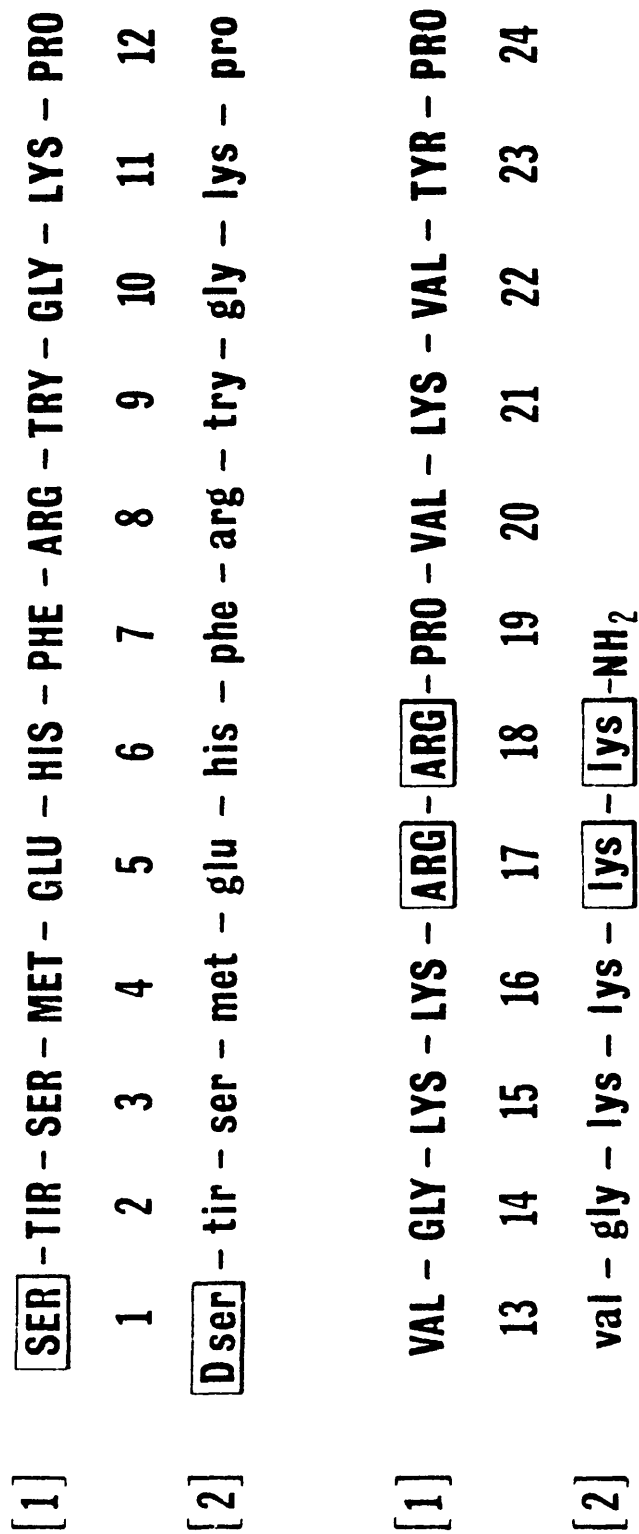


Fig. 11.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos tras la administración de 0,25 mgr. de NUVACTHEN por vías intramuscular o intravenosa,



[1] : TETRACOSACTIDO

[2] : C-41.795-Ba

FIG. 12.- Estructuras del tetracosactido y del octadecapeptido y diferencias entre ambas.

	BASAL		2h.		4h.		8h.		12h.		24h.		48h.	
	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%
F.R.A.	10	100	24	240	34	340	34	340	39	390	32	320	20	200
I.S.A.	17	100	35	205	46	270	45	264	52	305	42	247	15	88
M.A.C.	18	100	35	194	41	227	44	244	44	244	35	194	13	72
N.V.O.	22	100	37	168	46	209	51	231	56	254	46	209	16	72
F.D.N.	23	100	38	165	50	217	49	213	57	247	35	152	20	86
C.R.R.	17	100	37	217	48	282	49	288	56	329	43	252	13	76
G.N.L.	14	100	41	292	55	392	57	407	63	450	48	342	16	114
R.M.E.	21	100	35	166	45	214	49	233	53	252	40	190	18	85
S.N.Z.	14	100	55	392	70	500	73	521	90	642	65	464	14	100
F.R.E.	21	100	42	200	44	209	50	238	49	233	41	195	13	61
J.B.M.	11	100	41	372	48	436	45	409	46	418	31	281	12	109
M.A.S.	30	100	46	153	57	190	56	186	59	196	38	126	31	103

\bar{x}	18.1	38.8	230	48.6	291	50.1	298	55.3	330	41.3	248	16.7	97
σ	+5.6	+7.4	+80.6	+8.99	+1031	+9.3	+10	+12.8	+126	-9.13	+93.6	+5.24	+47.7
sem	1.7	2.2	24.4	2.7	31.2	2.8	30.5	3.9	38.4	2.7	28.3	1.58	14.4

TABLA 15.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos obtenidos al administrar 1 mgr. de C-41795-Ba, por vía intravenosa.

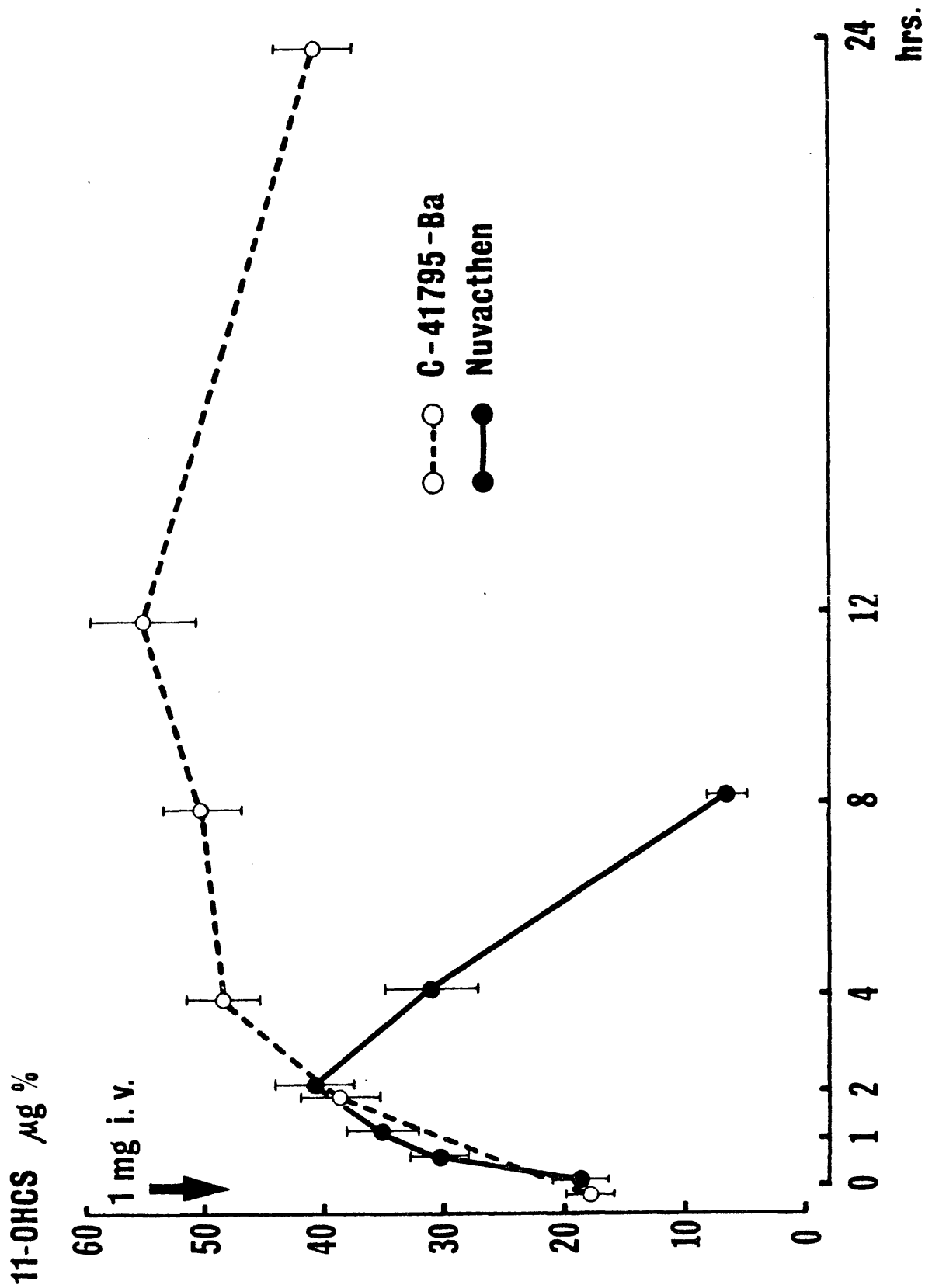


FIG. 13.- Comparacion de las respuestas de los 11-OH-CS plasmáticos al administrar por via endovenosa 1 mgr. de NUVACTHEN y 1 mgr. de C-41795-Ba.

	BASAL		2 h.		4 h.		8 h.		12 h.		24 h.		48 h.	
	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%
F.R.A.	18	100	37	205	38	211	30	166	27	150	5	27	16	88
I.S.A.	15	100	40	266	45	300	42	280	37	246	12	80	18	120
M.A.C.	15	100	32	213	35	233	34	226	31	206	5	33	16	106
N.V.O.	22	100	33	150	43	195	42	190	36	163	8	36	18	81
F.D.N.	19	100	38	200	45	236	47	247	45	236	12	63	17	89
C.R.R.	11	100	35	318	42	381	48	436	44	400	22	200	15	136
G.N.L.	16	100	51	318	53	331	47	293	47	293	26	162	13	81
R.M.E.	20	100	42	210	48	240	41	205	30	150	20	100	18	90
S.N.Z.	28	100	62	221	77	275	63	225	77	275	25	89	23	82
F.R.E.	12	100	35	291	44	366	41	341	41	341	12	100	13	108
J.B.M.	20	100	38	190	41	205	33	165	21	105	19	95	21	105
M.A.S.	26	100	44	169	52	200	52	200	46	176	16	61	23	88

\bar{x}	18.5	40.5	229	46.9	264	43.3	247	40.1	228	15.1	87	17.5	97.8
σ	+5.1	+8.5	+56.0	+10.8	+65.7	+9.0	+79.3	+14.2	+87.3	+7.3	+51.5	+3.3	+17.3
sem	1.5	2.5	16.9	3.2	19.9	2.7	24	4.3	26.4	2.2	15.6	1.02	5.2

TABLA 16.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos obtenidos al administrar 1 mgr. de C-41795-Ba por via intramuscular.



	BASAL		2h.		4h.		8h.		12h.		24h.		48h.	
	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%	mcg/100	%
F.R.A.	15	100	31	206	28	186	11	73	6	40	16	106	12	80
I.S.A.	17	100	40	235	44	258	47	276	36	211	14	82	11	64
M.A.C.	21	100	35	166	40	190	36	171	31	147	8	38	13	61
N.V.O.	21	100	34	161	48	228	45	214	39	185	8	38	11	52
F.D.N.	15	100	43	286	52	346	42	280	36	240	14	93	19	126
C.R.R.	10	100	36	360	45	450	46	460	42	420	13	130	12	120
G.N.L.	29	100	49	168	58	200	49	168	30	103	13	44	20	68
R.M.E.	14	100	44	314	46	328	36	257	25	178	18	128	19	135
S.N.Z.	21	100	52	247	66	314	64	304	63	300	12	57	18	85
F.R.E.	11	100	39	354	43	390	32	290	19	172	17	154	17	154
J.B.M.	18	100	36	200	40	222	28	155	24	133	11	61	21	116
M.A.S.	31	100	43	138	49	158	49	138	38	122	13	41	29	93

\bar{x}	18.5	40.1	236	46.5	272	40.4	232	32.4	187	13.0	81	16.8	96
σ	± 6.4	± 6.2	± 76.8	± 9.5	± 91.9	± 13.2	± 101.6	± 9.9	± 99.1	± 3.1	± 94.4	± 5.3	± 33.1
sem	1.9	1.9	23.2	2.9	27.8	4.02	30.7	3.02	30.05	0.95	28.6	1.6	10.06

TABLA 17.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos obtenidos al administrar 1 mgr. de C-41795-Ba por vía subcutánea.

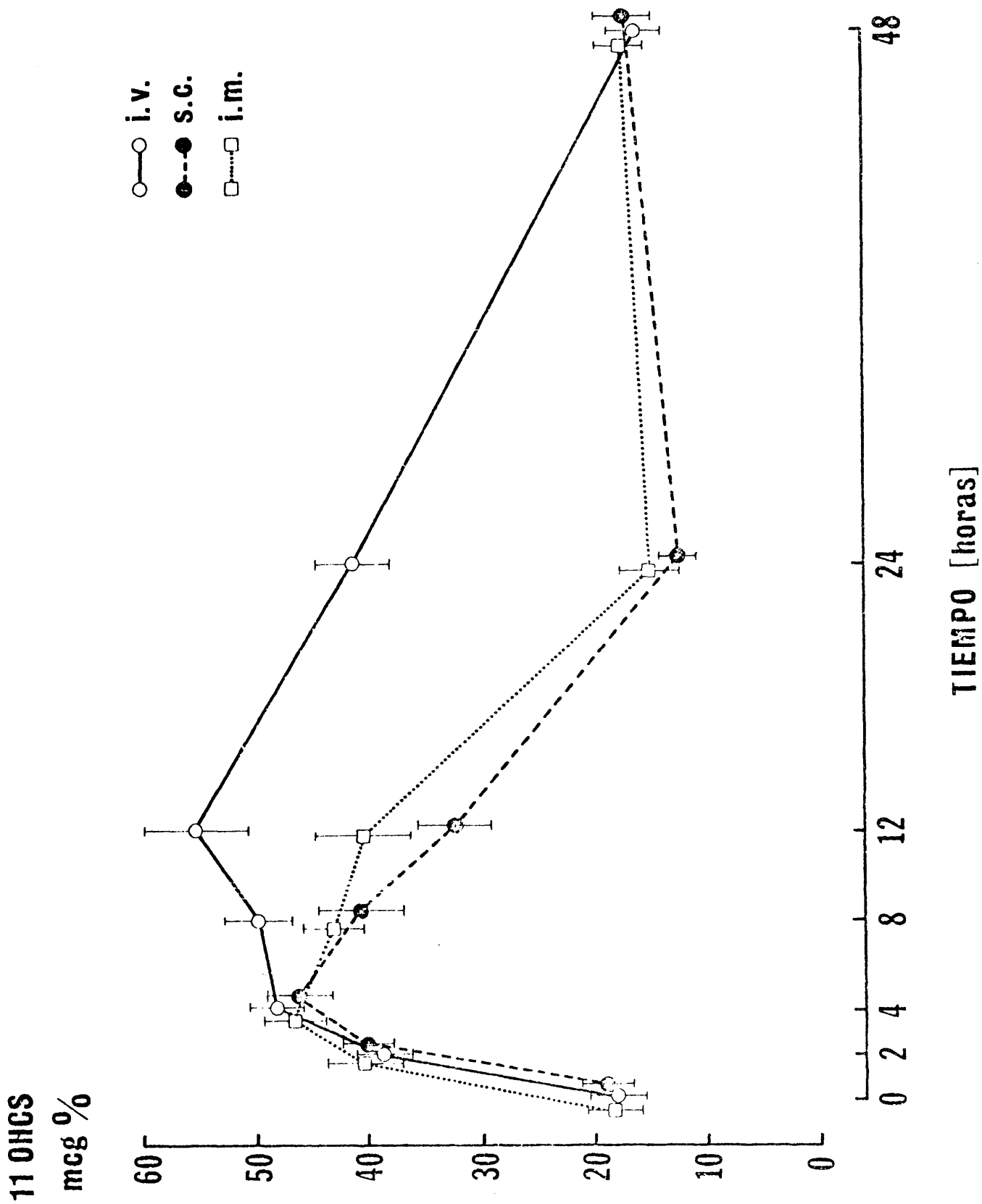


FIG. 14.- Comparación de las respuestas de los 11-OH-CS plasmáticos al administrar 1 mgr. de C-41795-Ba por las tres vías.

ANALISIS DE VARIANZA

	S. C. D.	G L	C. M.
Vias administ.	$Q_1 = 2788.32$	2	$S_1^2 = 1394.16$
Cinetica	$Q_2 = 37651.91$	6	$S_2^2 = 6275.31$
Interaccion	$Q_3 = 7877.15$	12	$S_3^2 = 656.42$
Residual	$Q_4 = 17471.58$	231	$S_4^2 = 75.63$
Total	$Q = 65788.96$	251	

$$F_1 = \frac{S_1^2}{S_4^2} = 18.43$$

$$F_2 = \frac{S_2^2}{S_4^2} = 82.77$$

$$F_3 = \frac{S_3^2}{S_4^2} = 8.679$$

TABLA 18.- Valores de F, (Análisis de varianza), al comparar entre si las distintas vías de administración.

	BASAL		2h.		4h.		8h.		12h.		24h.		Δ2h. μg/
	μg/100	%	μg/100	%	μg/100	%	μg/100	%	μg/100	%	μg/100	%	
F.D.N.	14	100	41	292	39	278	11	78	5	35	13	92	27
M.S.R.	20	"	40	200	28	140	8	40	4	20	20	100	20
J.M.P.	21	"	40	190	34	162	11	52	5	23	22	104	19
L.J.N.	16	"	32	200	22	137	7	43	12	75	17	106	16
J.A.R.	21	"	35	166	29	138	12	57	5	23	14	65	14
V.M.T.	15	"	41	273	31	206	9	60	4	26	15	100	26
\bar{x}	178	"	381	220	30,5	176	9,6	55	5,8	34	168	95	20,3
σ	+319	"	+376	+50,2	+5,75	+56,2	+1,97	+13,6	+3,06	+20,9	+35,5	+14,8	+52,4
s.e.m.	13	"	1,53	20,5	2,35	22,9	0,8	5,5	1,25	8,5	14,5	60,4	21,4

TABLA 19.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos obtenidos al administrar 0,125 mgr. de C-41795-Ba por vía intravenosa.

	BASAL		2 h.		4 h.		8 h.		12 h.		24 h.		$\Delta 2h$
	$\mu g/100$	%	μg	%	μg	%	μg	%	μg	%	μg	%	μg
F.D.N.	15	100	46	306	47	313	26	173	12	50	14	93	31
M.S.R.	16	"	42	262	36	225	12	75	5	31	14	87	26
J.M.P.	18	"	40	222	39	216	20	111	7	38	19	105	22
L.J.N.	21	"	35	166	27	87	10	47	6	28	19	90	14
J.A.R.	19	"	34	178	38	200	33	173	24	126	13	68	15
V.M.T.	17		42	247	47	276	31	182	16	94	13	76	25
\bar{x}	17,6	"	39,8	230	39,1	220	22,0	127	11,6	66	15,3	87	22,1
σ	+2,16	"	+4,58	+52,8	+7,5	+77,3	+9,65	+57,6	+7,34	+40,08	+2,88	+13,05	+6,62
s.e.m	0,88	"	1,87	21,5	3,06	31,5	3,94	23,5	2,99	16,3	1,18	5,33	2,7

TABLA 20.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos obtenidos al administrar 0,250 mgr. de C-1795-Ba por vía intravenosa.

	BASAL		2 h.		4 h.		8 h.		12 h.		24 h.		$\Delta 2h.$
	$\mu g/100$	%	$\mu g/100$	%	$\mu g/100$	%	$\mu g/100$	%	$\mu g/100$	%	$\mu g/100$	%	
F.D.N.	15	100	41	273	52	346	35	233	17	113	10	66	26
M.S.R.	20	"	41	205	44	220	34	170	21	105	14	70	21
J.M.P.	19	"	39	205	47	247	34	178	19	100	24	126	20
L.J.N.	22	"	41	186	39	177	26	118	12	54	25	113	19
J.A.R.	17	"	36	211	38	223	42	247	34	200	11	64	19
V.M.T.	21	"	49	233	48	228	40	190	36	171	15	71	28
\bar{X}	19.0		41.1	219	44.6	240	35.1	189	23.1	124	16.5	85	22.1
σ	± 2.6		± 4.31	± 30.5	± 5.4	± 56.7	± 5.6	± 46.5	± 9.6	± 52.8	± 6.4	± 27.1	± 3.8
s.e.m.	1.06		1.76	12.4	2.2	23.1	2.29	18.9	3.9	21.5	2.6	11.06	1.55

TABLA 21.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos obtenidos al administrar 0,500 mgr. de C-41795-Ba por vía intravenosa.

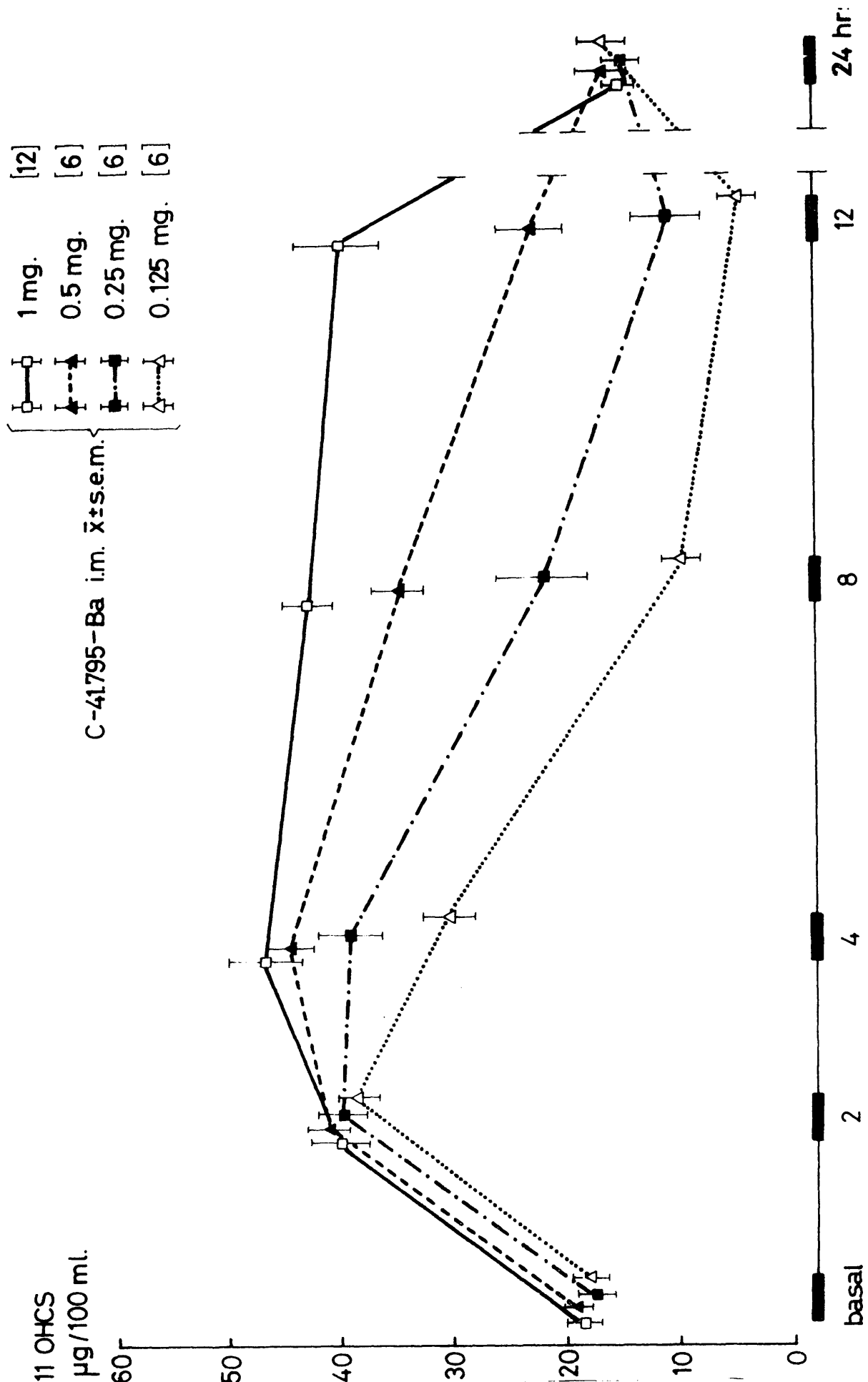


FIG. 15. - Comparación de las respuestas de los 11-OH-CS plasmáticos, obtenidas al administrar 0,125, 0,250, 0,500 y 1 mgr. por vía intravenosa.

Comparación de dosis	2h.	4h.	8h.	12h.	24h.
0.125 vs 0.250	-	-	$p < 0.05$	-	-
0.125 vs 0.500	-	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	-
0.125 vs 1.000	-	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	-
0.250 vs 0.500	-	-	$p < 0.05$	-	-
0.250 vs 1.000	-	-	$p < 0.01$	$p < 0.01$	-
0.500 vs 1.000	-	-	-	$p < 0.05$	-

TABLA 22.-

Valor de la probabilidad (p) estadística de que las diferencias de concentraciones de 11-OHCS en las distintas dosis i. m. de C-41795-Ba se deban al azar.

	ORINA BASAL				DIA DE LA ADMINISTRACION				DIA TRAS LA ADMINISTRACION			
	17-KS		17-OH		17-KS		17-OH		17-KS		17-OH	
	mg/dia	%	mg./dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%
1 F.R.A.	16	100	14,3	100	12	75	11,2	78	23,7	148	22,7	159
2 I.S.A.	23,2	100	13,8	100	14	60	14,6	106	15	64	10,9	79
3 M.A.S.	12,6	100	10,7	100	19,4	154	22,6	211	25,3	201	22,6	211
4 J.B.M.	17,6	100	8,9	100	17	97	20,7	233	33	188	20,7	233
5 F.D.N.	10,6	100	7,4	100	13	123	15,2	205	8,8	83	8,2	111
6 C.R.R.	19,6	100	2,0	100	18,6	95	17,2	86	16,6	85	16	80
7 G.N.L.	14	100	15,4	100	15,6	111	22,3	145	12,6	90	14	91
8 R.M.E.	13,4	100	11,9	100	16,8	125	17,9	150	10	75	7	59
9 S.N.Z.	19,6	100	12,2	100	20,8	106	14,3	117	13	66	7,9	65
10 F.R.E.	16,6	100	14,6	100	20	120	21,7	149	13,8	83	14	96
11 N.V.O.	15,4	100	10,6	100	13,4	87	10,2	96	12,7	82	9,8	92
12 M.A.C.	14	100	13,3	100	8,2	59	10,9	82	16,8	120	13,3	100
\bar{x}	16,05		12,75		15,73	101	16,56	198	15,62	107	13,92	115
σ	$\pm 9,51$		$\pm 3,35$		$\pm 3,78$	± 28	$\pm 4,52$	± 54	$\pm 9,51$	± 47	$\pm 5,61$	± 56
sem	1,06		1,01		1,13	8,4	1,36	16,2	2,86	14,1	1,68	16,8

TABLA 23.- Valores obtenidos de los 17-KS y T-17-OHS urinarios de 24 h. al administrar 0,25 mgr de NUVACTHEN por via intravenosa.

	BASAL		DIA ADMINISTRAC.		DIATRAS ADMINIS.	
	17KS mg/dla	17OHCS %	17KS mg/dla	17OHCS %	17KS mg/dla	17OHCS %
F.D.N.	10,4	100	13,3	100	7,2	69
C.R.R.	8,4	"	8,7	"	15,0	178
F.R.E.	10,4	"	9,8	"	11,0	106
J.B.M.	9,6	"	6,3	"	15,8	164
S.N.Z.	13,6	"	8,7	"	19,2	141
G.N.L.	12,2	"	11,0	"	13,0	106
R.M.E.	15,4	"	15,9	"	10,6	69
M.A.S.	17,8	"	15,1	"	11,6	65
N.V.O.	10,0	"	11,7	"	9,6	96
					87	65
					25,5	293
					19,0	194
					14,4	150
					15,1	111
					11,9	97
					9,4	61
					18,0	101
					10,8	104
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72
					5,2	60
					10,4	106
					10,9	173
					14,0	161
					15,2	138
					9,8	62
					18,7	124
					11,1	95
					9,6	72

11-OHCS
(mcg %)

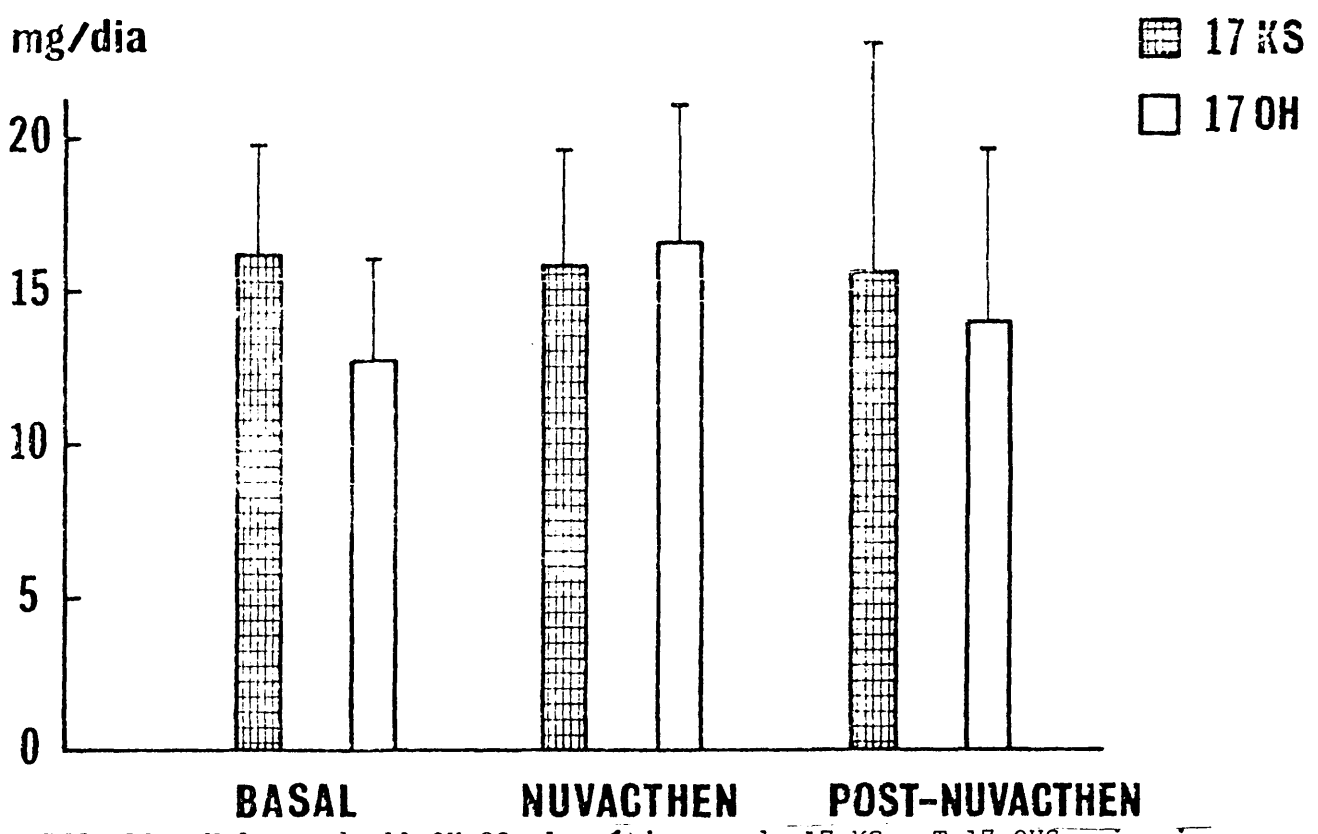
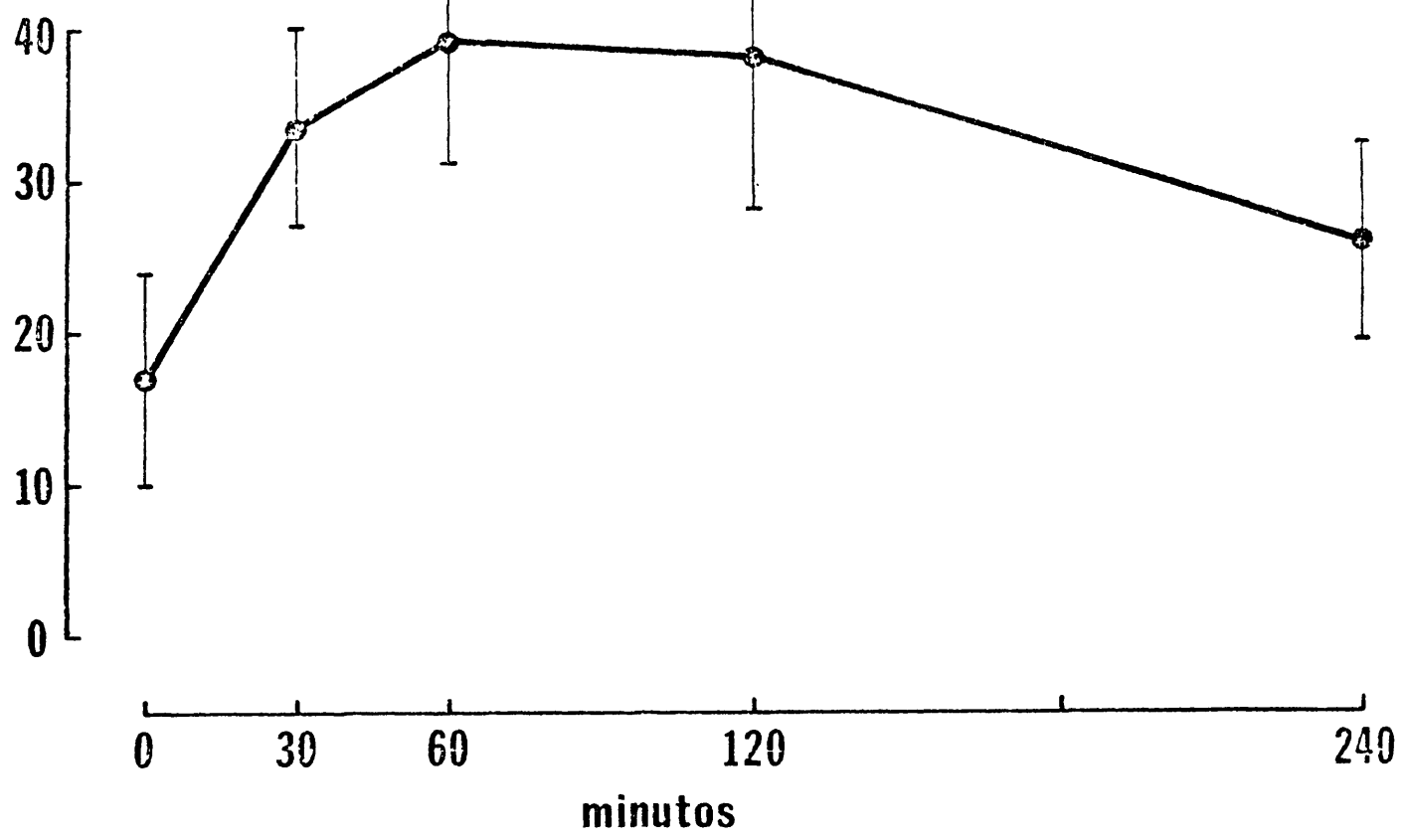


FIG. 16.- Valores de 11-OH-CS plasmáticos y de 17-KS y T-17-OHS urina-
rios, obtenidos al administrar 0,25 mgr. de NUVACTHEN por via intrave-
nosa.

	BASAL				DIA ADMINISTRACION				DIA TRAS ADMINISTRAC.			
	17 KS		17 OHCS		17 KS		17 OHCS		17 KS		17 OHCS	
	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%
F.R.A.	20.8	100	14.8	100	43.2	207	46	310	31.6	151	43.6	294
I.S.A.	5.4	..	4.7	..	14.8	274	26	553	30.8	570	76.4	1625
M.A.C.	15	..	9.9	..	26	173	52	525	21.2	141	53.6	541
N.V.O.	15.8	..	7.9	..	44	278	52	658	31.6	200	45.2	572
F.D.N.	12	..	11.4	..	34	283	53.2	466	18.6	155	34.6	303
C.R.R.	10.6	..	13.5	..	32	301	106.4	788	38	358	64.8	480
G.N.L.	30.4	..	19.2	..	40	131	91.2	475	45.6	150	76.4	398
R.M.E.	11.6	..	9.8	..	31.2	269	50.4	514	33.2	286	47.8	487
S.N.Z.	24	..	15.4	..	48.8	203	76.4	496	68	283	102	662
F.R.E.	12.6	..	11.4	..	36.8	292	63.2	554	28.8	228	71.2	624
J.B.M.	6.8	..	4.1	..					21.2	311	24.7	602
M.A.S.	11.4	..	10.6	..	34.6	303	53.4	503	18.8	165	14	132

\bar{x}	14.7		11		35	247	60.9	531	32.2	250	54.5	560
σ	± 7.2		± 4.3		± 9.4	± 58.3	± 22.4	± 119	± 13.8	± 124.7	± 24.8	± 370
sem	2.1		1.3		2.9	18.4	7.09	37.6	4.2	37.8	7.5	112.2

TABLA 25.- Valores de los 17-KS y T-17-OHS urinarios obtenidos al administrar 1 mgr de C-41795-Ba por via intravenosa.

	BASAL						DIA ADMINISTRACION						DIA TRAS ADMINISTRACION					
	17 KS		17 OHCS		17 KS		17 OHCS		17 KS		17 OHCS		17 KS		17 OHCS			
	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%		
F.R.A.	27	100	24.8	100	32.4	120	46.8	188	9.6	35	10.2	41	9.6	35	10.2	41		
I.S.A.	9.6	"	8.6	"	9.2	95	29.5	343	16	166	12.3	143	16	166	12.3	143		
M.A.C.	10.9	"	8.1	"	16.5	151	30.7	379	16.2	148	10.5	129	16.2	148	10.5	129		
N.V.O.	14.8	"	12.7	"	28.8	194	40.8	321	8.6	58	5.6	44	8.6	58	5.6	44		
F.D.N.	8.8	"	6.9	"	19.8	225	19.9	288	20.6	234	16.7	242	20.6	234	16.7	242		
C.R.R.	16.3	"	14.8	"	28.8	176	69.2	467	24.4	149	27.9	188	24.4	149	27.9	188		
G.N.L.	4.4	"	7	"	20.2	459	78.4	1120	11.4	259	22.6	322	11.4	259	22.6	322		
R.M.E.	18	"	14.8	"	18	100	34.6	233	16.4	91	15.9	107	16.4	91	15.9	107		
S.N.Z.	35.6	"	18	"	60	168	74.4	413	26.8	75	26.3	146	26.8	75	26.3	146		
F.R.E.	12.7	"	9.8	"	14.4	113	28.7	292	20.6	162	26.8	273	20.6	162	26.8	273		
J.B.M.	17.2	"	12.7	"	41.6	241	51.8	407	32.4	188	23.4	184	32.4	188	23.4	184		
M.A.S.	19.6	"	15.4	"	39.2	200	85.2	553	29.5	150	14.2	92	29.5	150	14.2	92		

\bar{x}	16.2		12.8		27.4	187	49.1	417	19.3	143	17.7	159	19.3	143	17.7	159
σ	± 8.4		± 5.2		± 14.3	± 98.3	± 21.9	± 243	± 7.7	± 68	± 10.4	± 87.1	± 7.7	± 68	± 10.4	± 87.1
sem	2.5		1.6		4.3	29.8	6.6	73.6	2.3	20.6	3.1	26.4	2.3	20.6	3.1	26.4

TABLA 26.- Valores de los 17-KS y T-17-OHS urinarios obtenidos al administrar 1 mgr de C-41795-Ba por via intramuscular.

	BASAL				DIA ADMINISTRACION				DIA TRAS ADMINISTRACION			
	17 KS		17 OHCS		17 KS		17 OHCS		17 KS		17 OHCS	
	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%	mg/dia	%
F.R.A.	17.6	100	15.6	100	31.2	177	33.9	217	11.5	65	12	77
I.S.A.	14.8	"	10.6	"	25.2	170	39.2	370	20.8	140	15.4	145
M.A.C.	14.7	"	17	"	11	75	19.6	115	18.4	125	16.2	95
N.V.O.	13.6	"	9.8	"	24.4	179	32.4	330	13	96	7.7	78
F.D.N.	17.8	"	10.4	"	28	157	42.4	407	17.6	99	15.4	148
C.R.R.	15.6	"	13.6	"	21.5	138	61.4	451	20	128	23.1	170
G.N.L.	11.6	"	12.2	"	23.5	202	58.6	480	16.6	143	19.6	161
R.M.E.	14.1	"	13.3	"	20.8	147	32.8	247	15.2	108	16.7	125
S.N.Z.	28	"	15.1	"	61.2	218	80.8	535	27.8	99	20.3	134
F.R.E.	17.8	"	14.3	"	30.8	173	40.9	286	16.2	91	13.5	94
J.B.M.	10.4	"	7.2	"	41.6	400	55.2	766	12.8	123	14	194
M.A.S.	12.8	"	12.2	"	15	117	27.9	229	10.6	83	9.3	76
\bar{x}	15.7		12.6		27.8	179	43.7	369	16.7	108	15.2	125
σ	± 4.5		± 2.8		± 13.1	± 791	± 17.2	± 1748	± 4.8	± 238	± 4.4	± 403
sem	1.36		0.85		3.9	239	5.21	52.9	1.45	7.21	1.33	12.2

TABLA 27.- Valores de los 17-KS y T-17-OHS urinarios obtenidos al administrar 1 mgr. de C-41795-Ba por via subcutanea.

	11-OH	17-OH	11-OH	17-OH	11-OH	17-OH	11-OH	17-OH	11-OH	17-OH
F.R.A.	17	14,3	-	-	15	15,6	10	14,8	18	24,8
I.S.A.	16	13,8	-	-	17	10,6	17	4,7	15	8,6
M.A.S.	30	10,7	27	15,1	31	12,2	30	10,6	6	15,4
J.B.M.	14	8,9	20	6,3	28	7,2	11	4,1	20	12,7
F.D.N.	13	7,4	20	13,3	15	10,4	23	11,4	19	6,9
C.R.R.	7	20	8	8,7	10	13,6	17	13,5	20	14,8
G.N.L.	31	15,4	18	11	29	12,2	14	19,2	16	7
R.M.E.	19	11,9	20	15,9	14	13,3	21	9,8	20	14,8
S.N.Z.	21	12,2	18	8,7	21	15,1	14	15,4	28	18
F.R.E.	11	14,6	17	9,8	11	14,3	21	11,4	12	9,8
N.V.O.	10	10,6	20	11,7	21	9,8	22	7,9	22	12,7
M.A.C.	15	13,3	21	17	21	17	18	9,9	15	8,1

TABLA 28.- Valores basales (9 a.m.) de 11-OH-CS plasmáticos en gr/100 ml y 17-OH-CS urinarios en mgr (24 horas), correspondientes al mismo día.

	Intravenosa		Intramuscular		Subcutanea	
	17-OH-CS	S	17-OH-CS	S	17-OH-CS	S
F.R.A.	46	560	46,8	140	33,9	-11
I.S.A.	26	665	29,5	406	39,2	381
M.A.C.	52	517	30,7	238	19,6	147
N.V.O.	52	634	40,8	193	32,4	269
F.D.N.	53,2	559	19,9	394	42,4	437
C.R.R.	106,4	729	69,2	619	61,4	575
G.N.L.	91,2	945	78,4	613	58,6	119
R.M.E.	50,4	582	34,6	292	32,8	356
S.N.Z.	76,4	1400	74,4	729	80,8	651
F.R.E.	63,2	571	28,7	490	40,9	336
J.B.M.	-	-	51,8	153	55,2	148
M.A.S.	53,4	497	85,2	318	279	98

TABLA 29.- Valores basales de 17-OH-CS en mg/24 h. el día de la administración de 1 mgr. de C-41795-Ba por las tres vías y valores del area encerrada entre la curva de concentraciones plasmáticas de 11-OH-CS y la ordenada correspondiente al valor basal (S), para el mismo día.

mg/24 hrs.

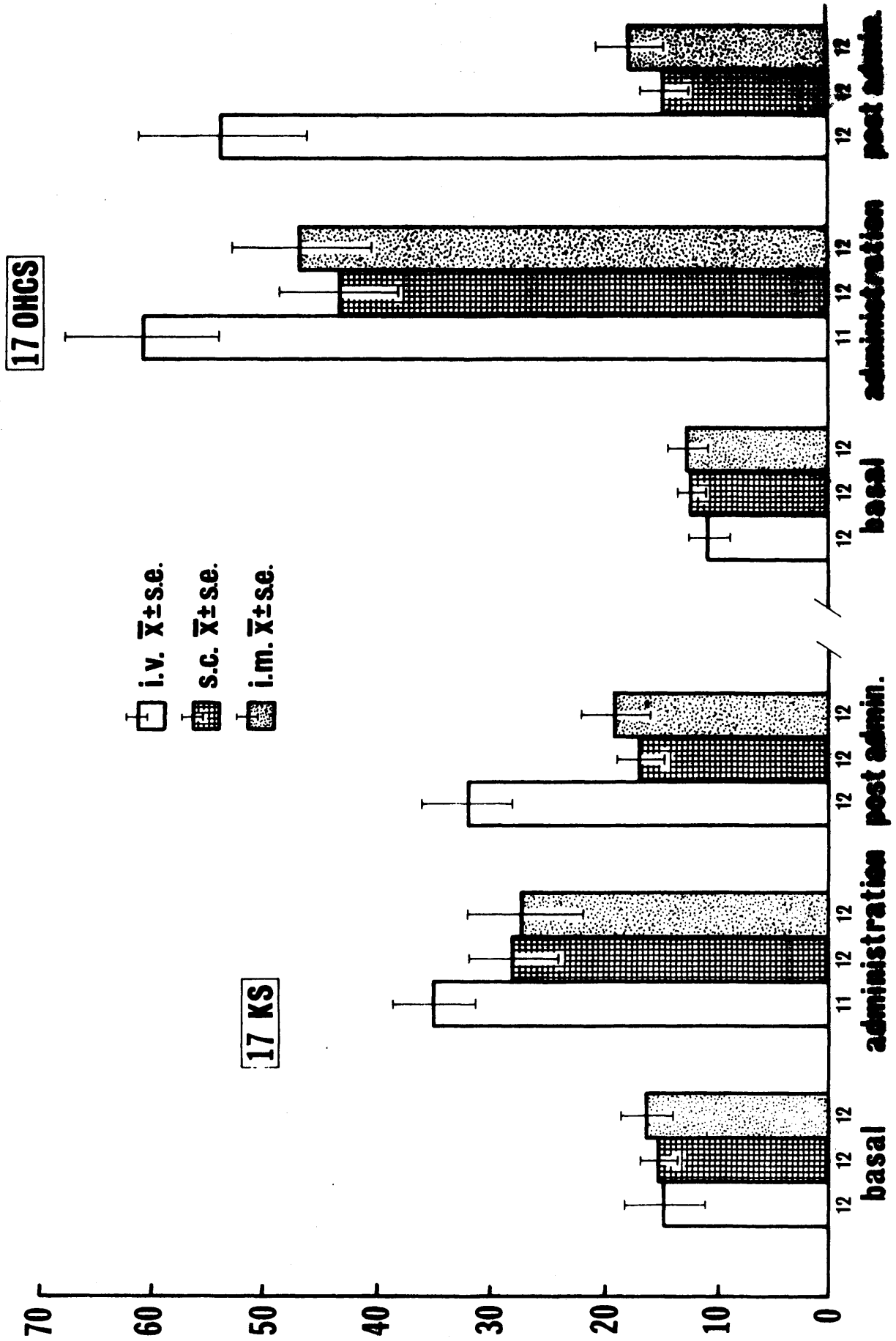


FIG. 17.- Comparación de las respuestas obtenidas de los 17-KS y T-17-OHS urinarios al administrar 1 mgr. de C-41795-Ba por las tres vías.

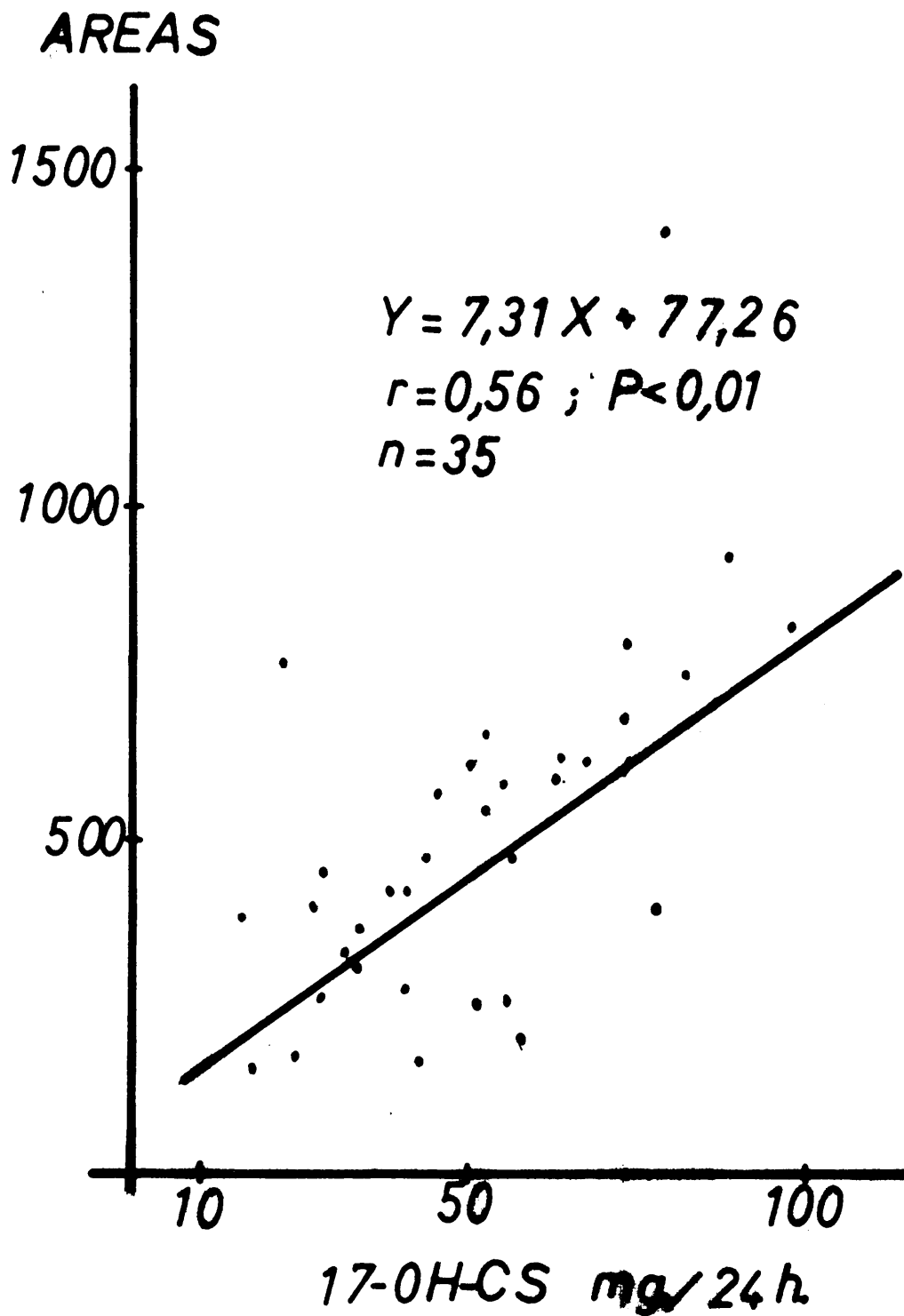


FIG. 18.- Recta de regresión obtenida, comparando los I-17-OHS urinarios de 24 h. con las áreas comprendidas entre la curva de concentraciones plasmáticas de 11-OH-CS y la ordenada correspondiente al valor basal.

IV.2. ANALISIS DE LOS VALORES DE 11-OH-CS PLASMATICOS EN UNA POBLACION

"CONTROL" AMBULATORIA HOSPITALARIA.-

IV.2.1. Basales y distribución por sexos y edades

En las 611 muestras de plasma tomadas a las 9 A.M. los valores de 11-OH-CS obtenidos son $16,40 \pm 5,70$ (D.S.). Para establecer el rango de esta población, se realizó un test de ajuste a una población gaussiana (χ^2) resultando negativo, siendo necesario emplear por lo tanto unos tests no paramétricos, hemos utilizado el test de Wilks y obtenemos un rango para la población estudiada desde 6 a $29 \mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$ a $p < 0,05$. Estos datos pueden observarse en la tabla 30.

Distribución por sexos: Se agruparon los datos obtenidos para varones y hembras, como puede observarse en la figura 19, no encontrándose diferencias entre ambos grupos.

Distribución por edades: La clasificación del grupo total según la edad (fig. 20 y la aplicación de la prueba U demostró que no había diferencias entre estos grupos.

IV.2.2. Estimulación con el β^{1-24} -ACTH

Los valores obtenidos 60 minutos después de la administración a 149 sujetos de 0,25 mgr. del tetracosáctido por vía intramuscular, se reflejan en la tabla 31.

El cálculo de las diferencias respecto al correspondiente valor basal se realizó estudiando el incremento relativo.

$$\Delta_r = \frac{F_{PN} - F_B}{F_B} \times 100$$

en donde F_{PN} son los 11-OH-CS plasmáticos a los 60' de la administración y F_B valor basal. La media obtenida fue $F_{PN} = 2,25 \times F_B$. El rango de estas diferencias por el mismo método no paramétrico para $p < 0,05$ resultó ser ($1,3 F_B - 4,17 F_B$). Estos resultados expresan que para poder aceptar la prueba como positiva, el valor basal ha de incrementarse como mínimo en un 30 % después de la inyección de tetracosáctido.

Es evidente que el valor obtenido a los 60' de la administración de 0,25 mgr. de Nuvacthen, depende del correspondiente valor basal y mediante el método anterior (incremento relativo) se ha anulado esta dependencia.

Para estudiar el incremento en función de la cifra basal hemos clasificado los datos en dos grupos: 1º) aquellos cuya cifra de 11-OH-CS basal es inferior a la media (16,4 µgr /100 ml.) y 2º) aquellos cuya cifra de 11-OH-CS basal es superior a la media.

El estudio estadístico demostró (test de Mann-Whitney) que el incremento era mayor para el primer grupo que para el segundo ($p < 0,01$).

La representación llevando en abcisas el valor basal (B) y en ordenadas el incremento absoluto ($\Delta = F_{PN} - F_B$) y el cálculo de la recta de regresión, puede verse en la figura 21. El coeficiente de correlación obtenido es $r = 0,46$, distinto de cero a $p < 0,01$.

IV.2.3. Estudio del ritmo espontáneo de secreción

Los valores obtenidos en las muestras correspondientes a las 20 h. se reflejan en la tabla 32.

El cálculo de las diferencias se realizó, igual que en el caso anterior, primero estudiando los incrementos relativos (para disminuir el efecto de la concentración basal) aplicando la fórmula:

$$\Delta_r = \frac{F_B - F_R}{F_B} \times 100$$

siendo F_B la concentración de los 11-OH-CS a las 9 h., F_R concentraciones de los 11-OH-CS a las 20 h. La media obtenida fue $F_R = 0,42 F_B$ y el rango correspondiente para $p < 0,05$ calculando también por el método de los percentiles ($0,75 F_B - 0,12 F_B$), es decir, para poder asegurar la existencia de ritmo de secreción, el máximo valor obtenido a las 20 h. debe ser inferior al 75 % del correspondiente valor basal. Entendiendo que el descenso es tanto mayor cuanto más grande es el valor basal, hemos clasificado los incrementos en dos grupos: Grupo I : valor basal menor que la media ($16,4 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$) y grupo II: valor basal mayor que la media. Los decrementos obtenidos para el primer grupo son $X = 6,93 \pm 2,45$ (D.S.) $\mu\text{gr}/100 \text{ ml}$ para $n = 67$ y $X = 13,85 \pm 4,22$ (D.S.) $\mu\text{gr}/100 \text{ ml}$ para $n = 78$, en ambos casos se trata de los decrementos absolutos ($F_B - F_R$). Las diferencias entre estos grupos son altamente significativas ($p < 0,01$).

El estudio de la recta de regresión y el coeficiente de correlación correspondiente se muestran en la figura 22.

IV.2.4. Inhibición con Dexametasona

Los resultados obtenidos a las 9 A.M. después de tomar a las 23 h. del día anterior 1 mgr. de dexametasona se encuentran en la tabla 33.

Como en los casos anteriores calculamos los incrementos en tanto por ciento de la basal, de acuerdo con la fórmula:

$$\Delta_r = \frac{F_B - F_{DxM}}{F_B} \times 100$$

en donde F_B = concentración de 11-OH-CS a las 9 A.M. y F_{DxM} = la concentración de los 11-OH-CS a las 9 A.M., del día siguiente, después de ingerir la dexametasona la noche anterior. El valor medio obtenido fue $F_{DxM} = 0,27 F_B$, con unos límites de variación ($0,60 F_B$ a $0,1 F_B$) a $p < 0,05$, es decir para poder asegurar que exista supresión, el valor obtenido debe ser como máximo inferior en un 40 % del correspondiente valor basal.

También hemos clasificado, los decrementos en dos grupos, de acuerdo con el valor basal, obteniéndose para el primer grupo $X = 9,4 \pm 2,65$ (DS) $\mu\text{gr}/100$ ml, $n = 34$ y, para el segundo $X = 16,42 \pm 4,87$ (DS) $\mu\text{gr}/100$ ml., $n = 36$. Las diferencias son altamente significativas $p < 0,01$ y en ambos casos se trata de los decrementos absolutos ($F_B - F_{DxM}$).

El estudio de las rectas de regresión y el valor del coeficiente de correlación para este caso, se encuentra en la figura 23.

n = 611

$\bar{x} = 16.4 \mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$

DS=5.7

s.e.m.= 0.23

rango:(6-29) $\mu\text{gr}/100 \text{ ml.}$

p<0.05

tabla 30 .- Valores basales de los 11-OH-CS plasmáticos obtenidos de una población "control" hospitalaria.

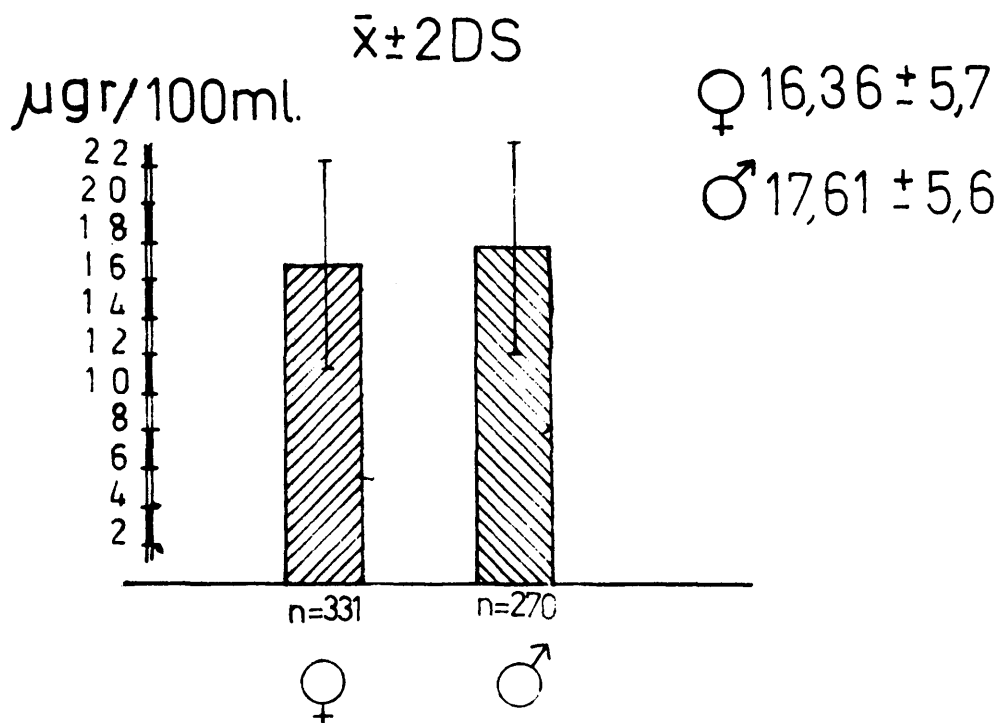


fig.19 .- Representación de los valores basales de los 11-OH-CS plasmáticos por sexos.

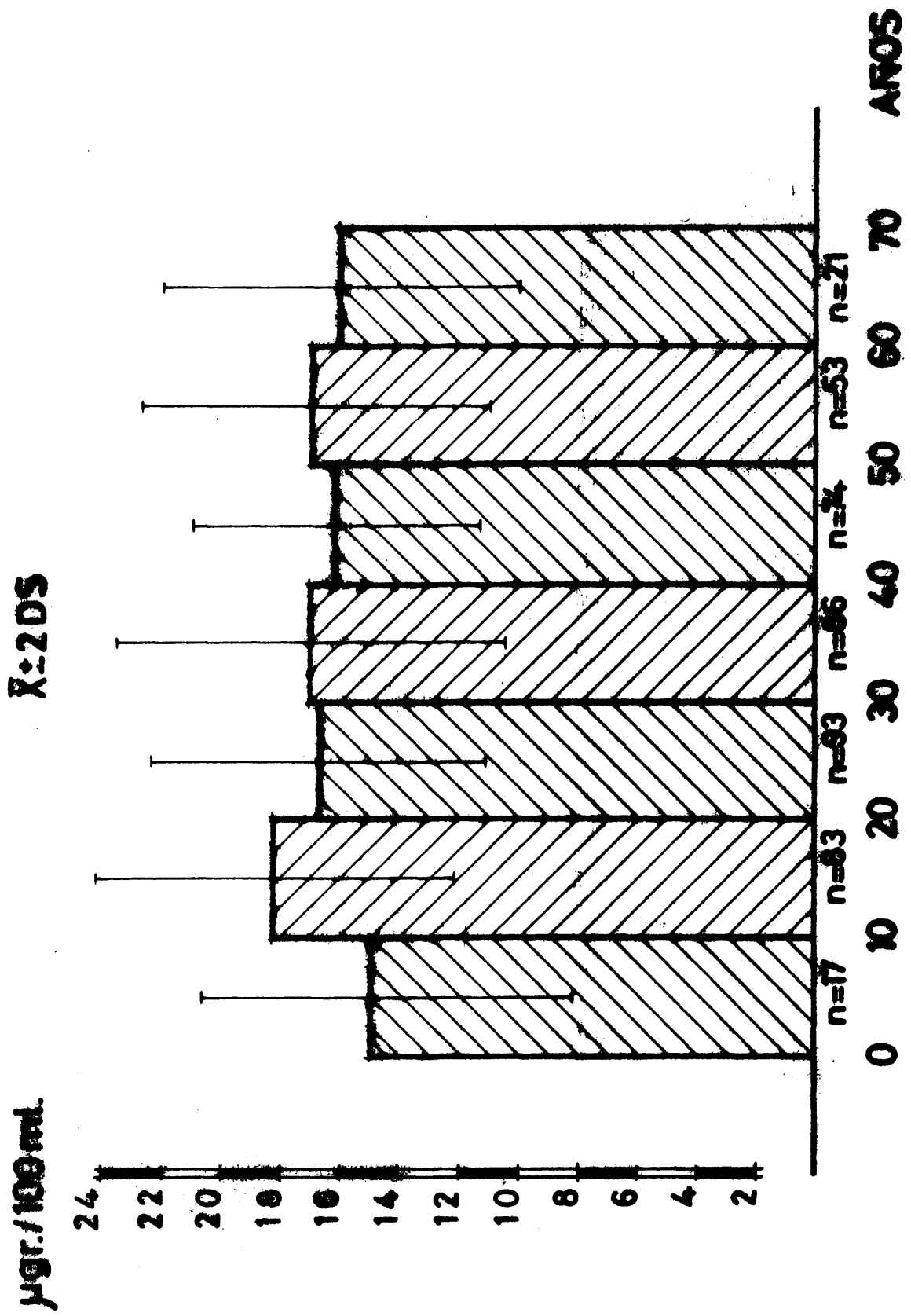


FIG. 20.- Histograma por edades de los valores basales de los 11-OH-CS plasmáticos.

n=149

$\bar{x} = 34.84 \mu\text{gr}/100\text{ml.}$

DS=7.43

s.e.m.=0.60

rango:(24-51) $\mu\text{gr}/100\text{ml.}$

$p < 0.05$

tabla 31.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos obtenidos a los 60' de la administración intravenosa de 0,25 mgr. de NUVACTHEN.

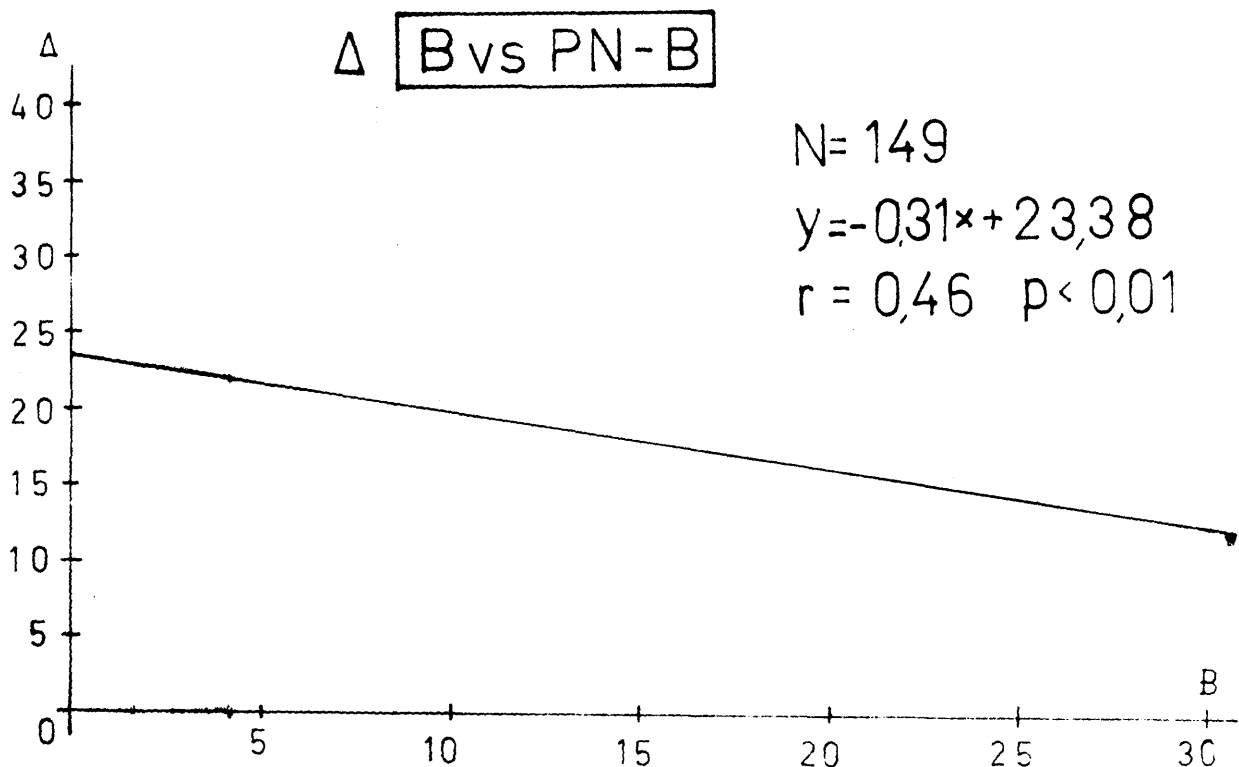


fig 21.- Recta de regresión y coeficiente de correlación entre el incremento absoluto de la cifra de los 11-OH-CS plasmáticos después de administrar 0,25 mgr. de NUVACTHEN y el correspondiente valor basal.

n=145

\bar{x} =7.22 μ gr/100ml.

DS=3.54

s.e.m.=0.29

rango:(3-14) μ gr/100 ml.

p < 0.05

tabla 32

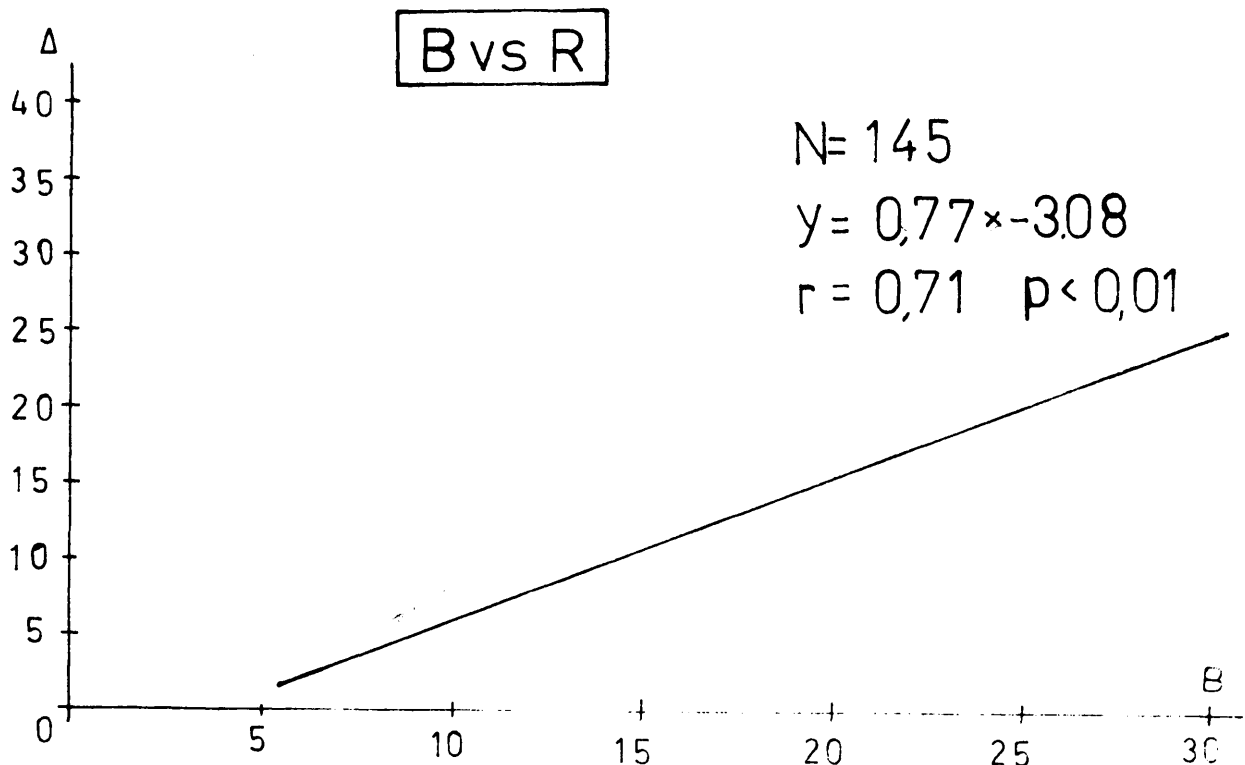


FIG. 22.- Recta de regresión y coeficiente de correlación entre los decrementos (Basal-Ritmo) y el correspondiente valor basal.

n=70

$\bar{x}=4.11 \mu\text{gr}/100\text{ml.}$

DS=2.84

s.e.m.=0.33

tabla 33.- Valores de los 11-OH-CS plasmáticos a las 9 a.m. despues de ingerir a las 23 h. del día anterior 1 mgr. de dexametasona.

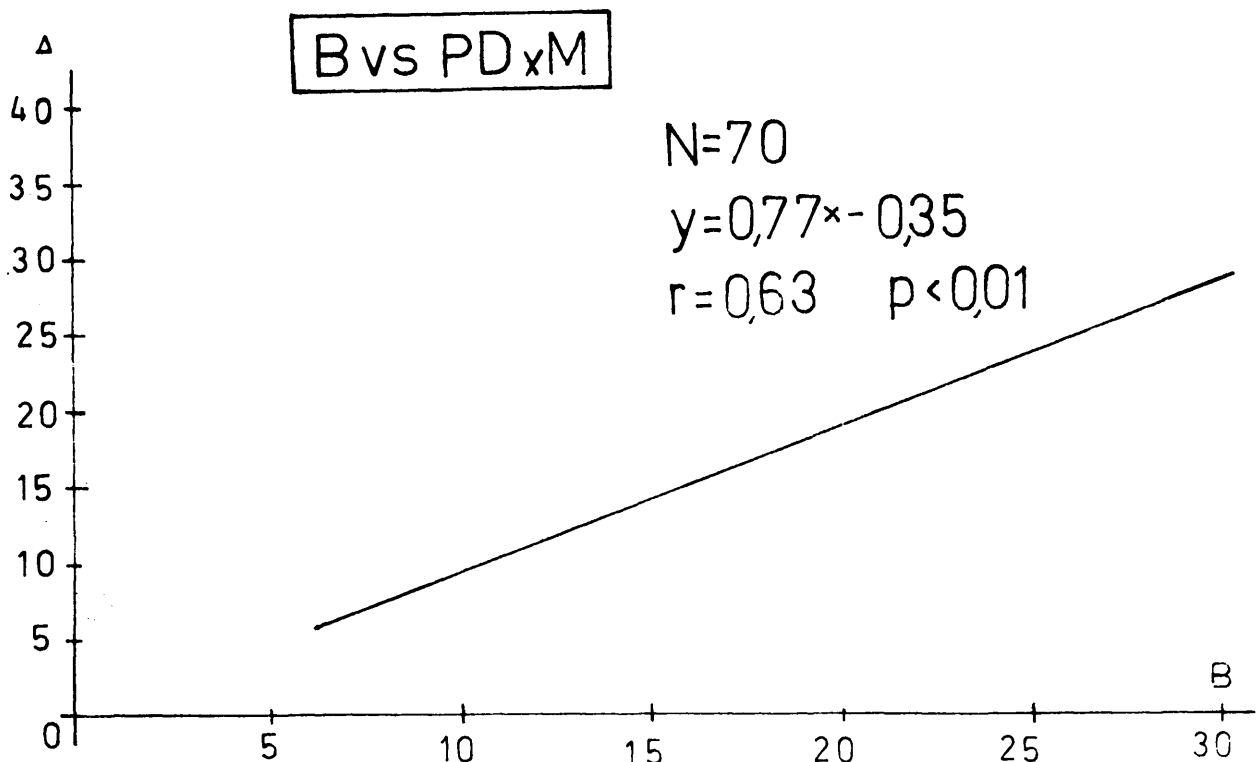


FIG. 23.- Recta de regresión y coeficiente de correlacion entre decremento absoluto tras la ingestion de 1 mgr. de dexametasona y el correspondiente valor basal.

IV.3.- CORTISOL LIBRE EN ORINA

IV.3.1. Variación del método por C.P.B.

La determinación de la estabilidad de la solución CBG-H³-F es de interés práctico y quedó establecida en un tiempo generalmente superior a 15 días, durante los cuales obtenemos valores para curvas standard, superponibles (Fig. 24), aunque por su importancia, es conveniente la comprobación regular de la misma, y obviamente, debe realizarse una curva standard con cada serie de muestras problema.

Recuperación.- La recuperación a través del proceso de extracción de F-H³ añadido a muestras de plasma fue de $98 \pm 3 \%$ (DS. En consecuencia, no parece necesario controlar rutinariamente este extremo mediante un standard interno (F-H³). En cambio, para las muestras de orina, la recuperación fue de $82 \pm 6 \%$ (DS).

Sensibilidad.- La técnica utilizada permite determinar 0,20 ng/tubo, lo que equivale a concentraciones de cortisol en plasma de $2,0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

Blanco.- El valor del blanco, obtenido a partir de 0,6 ml. de agua destilada, equivale a $1,28 \pm 0,43$ (DS) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. cifra que no es estadísticamente diferente de cero. El posible efecto del solvente sobre la curva standard fue estudiado añadiendo 0,4 ml/tubo de diclorometano a los standards.

sin que se observara efecto significativo sobre dicha curva standard (Fig. 25).

Especificidad.- La habilidad de la CBG para unir otros esteroides distintos de cortisol ha sido estudiada a través de la capacidad de estos esteroides, utilizados a distintas concentraciones, para desplazar el F-H³ de su unión con la CBG. En la tabla 34 y Fig. 26, se recogen la potencia relativa de algunos corticosteroides para competir frente al cortisol en el análisis descrito, claculada según la fórmula dada por Abraham.

Precisión.- Cortisol, a concentraciones de 4, 10, 20 y 50 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. fue añadido a muestras de un pool de plasma humano y procesadas según la técnica descrita. Los valores encontrados coinciden razonablemente con las cifras teoricas en cada caso, tal como se muestra en la Fig. 27. En dicha gráfica, la ordenada en el origen representa la cifra de corticosteroides del pool utilizado para las determinaciones.

Comparación con un método fluorimétrico.- Las figuras 28 y 29 muestran, respectivamente, el grado de correlación existente entre las cifras de corticosteroides plasmáticos y corticosteroides libres en orina determinados mediante la técnica descrita y las correspondientes cifras de 11-hidroxicorticoides hallados mediante la técnica fluorimétrica de Mattingly. La correlación entre ambos métodos para los valo-

res plasmáticos es excelente ($r = 0,92$), tal como se evidencia de la Fig. 28. Por el contrario, dicha correlación no es tan marcada ($r = 0,77$) para las determinaciones urinarias, siendo los valores obtenidos por CPB muy inferiores a los fluorimétricos, con los que presenta una notable dispersión. Fig. 29.

IV.3.2. Basales y post-estimulación con β^{1-24} -ACTH, en individuos normales obtenido con el método por C.P.B.

La tabla 35 recoge los cambios en la concentración plasmática de corticosteroides que siguen a la administración de 0,25 mg i.v. de β^{1-24} -ACTH a 10 sujetos normales, obteniéndose la conocida respuesta fisiológica de aumento en la concentración plasmática a los 60 y 120 minutos de la inyección.

IV.3.3. Estudio de cinco casos de hipercorticalismo

La tabla 36 recoge los distintos valores de cortisol plasmático obtenidos en la prueba rápida de función suprarrenal, así como los valores de cortisol libre urinario en condiciones basales de cinco enfermos diagnosticados de síndrome de Cushing por, hiperplasia, adenoma o carcinoma.

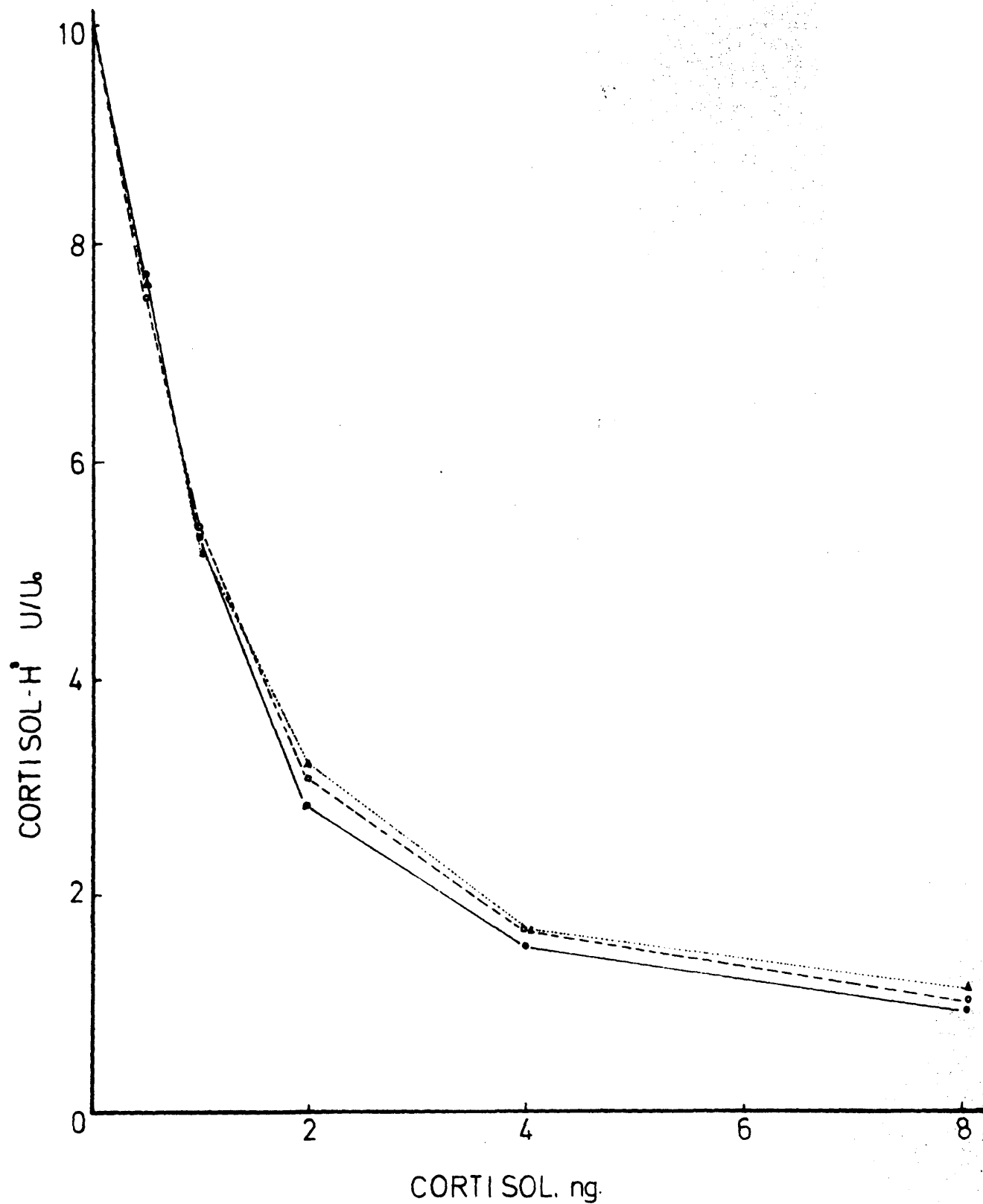


FIG. 24.- Estabilidad de la solución CBG-H³-F: Curvas standard obtenidas utilizando una misma solución recientemente preparada (●...●), 14 días (○...○) y 30 días (▲...▲) después de su preparación.

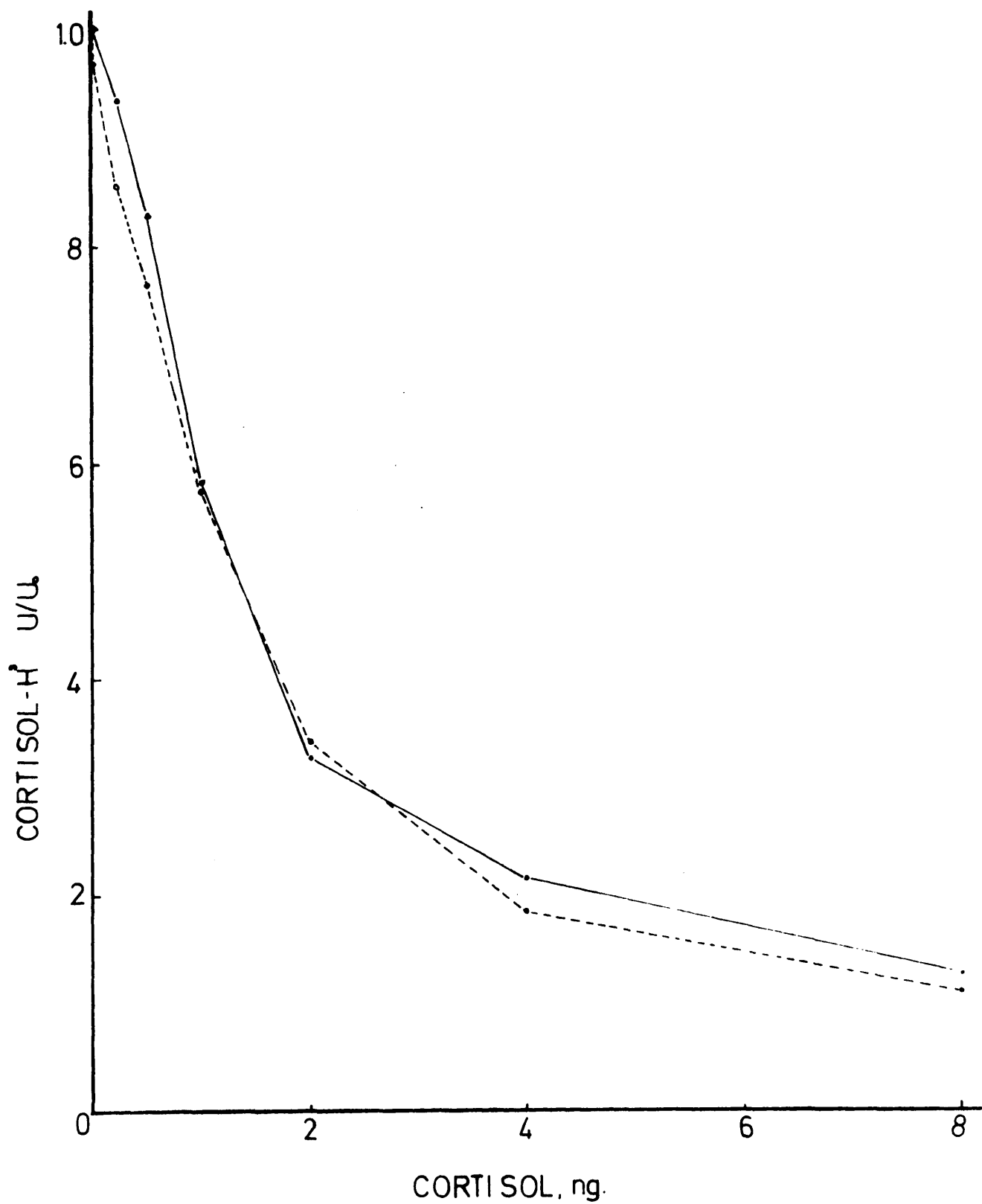


FIG. 25.- Efecto del solvente (diclorometano) utilizado en la extracción sobre la curva standard: (●...●) sin solvente. (○...○) despues de añadir 0,4 ml. de diclorometano a cada uno de los standard.

Esteroides	Pot.Rel. (%)
Cortisol	100
Corticosterona	210
11-Deoxicortisol	112
Deoxicorticosterona (DOC)	85
17 -OH-Progesterona	42,5
Progesterona	27,4
Cortisona	< 9

=====

TABLA 34.- Potencia relativa de algunos corticosteroides para competir con el cortisol.

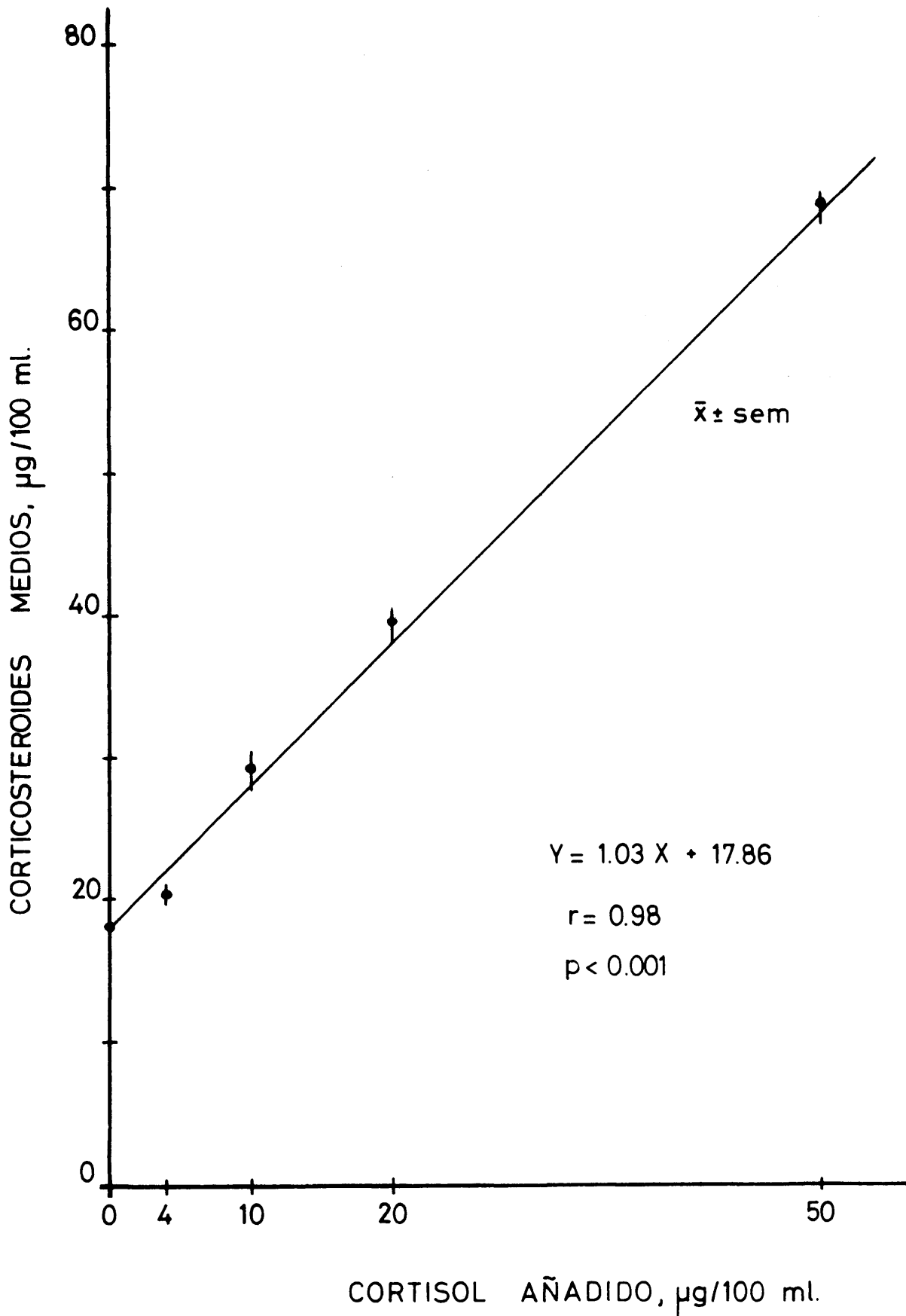


FIG. 27.- Correlación entre cortisol añadido a un pool de plasma ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) y corticosteroides determinados mediante CPB. La intersección de la recta de regresión con el eje de ordenadas corresponde a la concentración teórica de corticosteroides presentes en el pool de plasma. Cada punto representa el valor medio \pm sem de tres determinaciones.

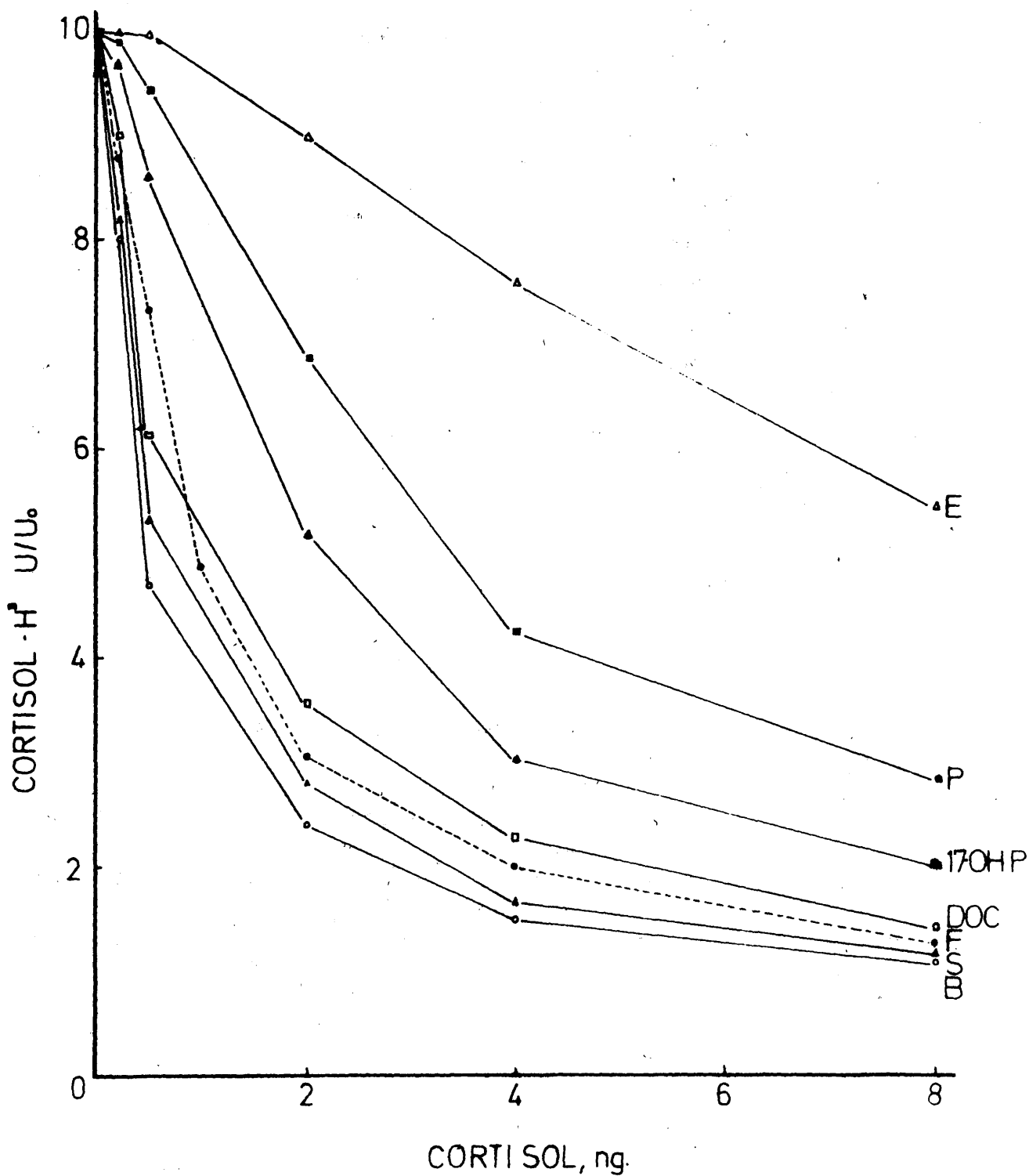
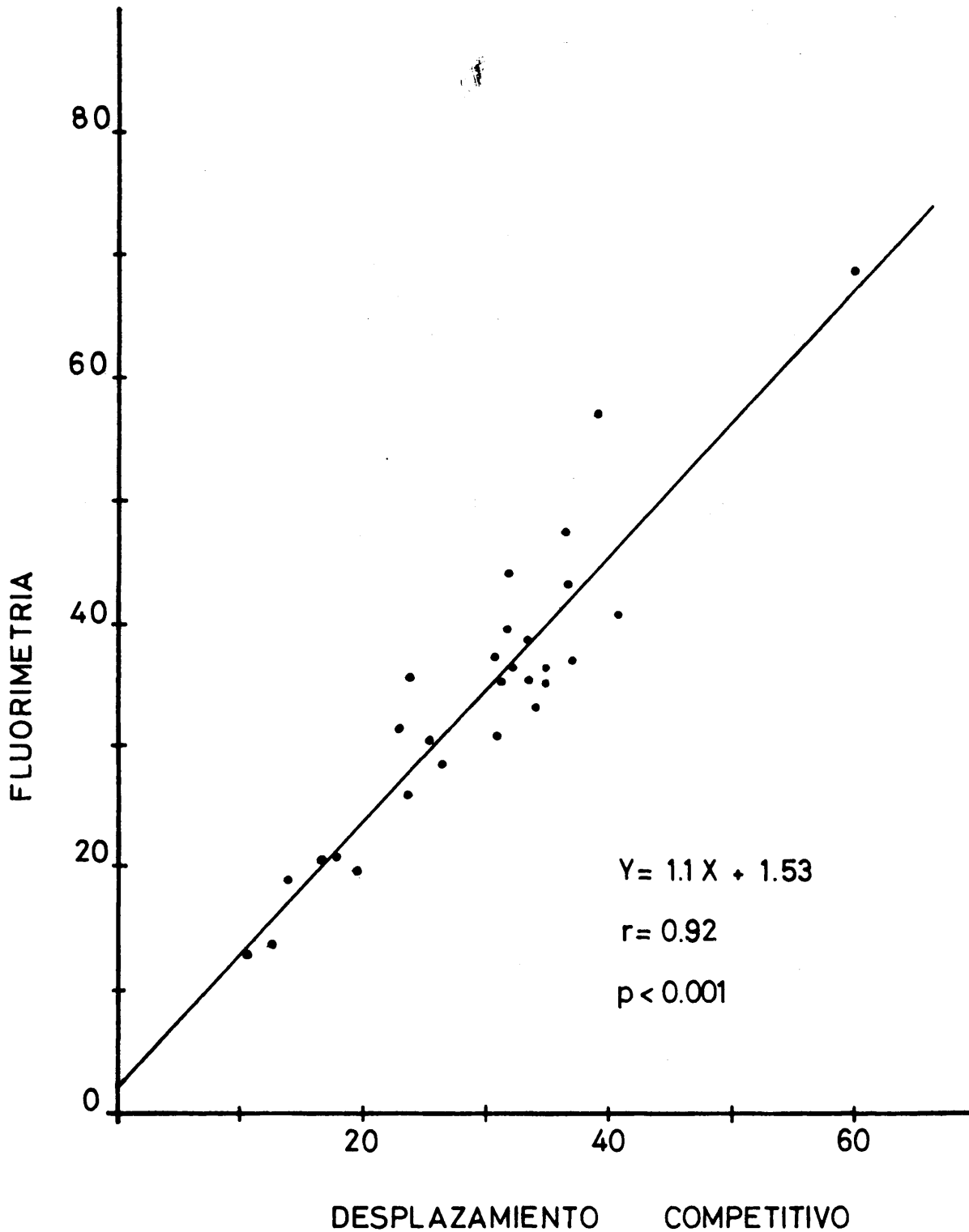
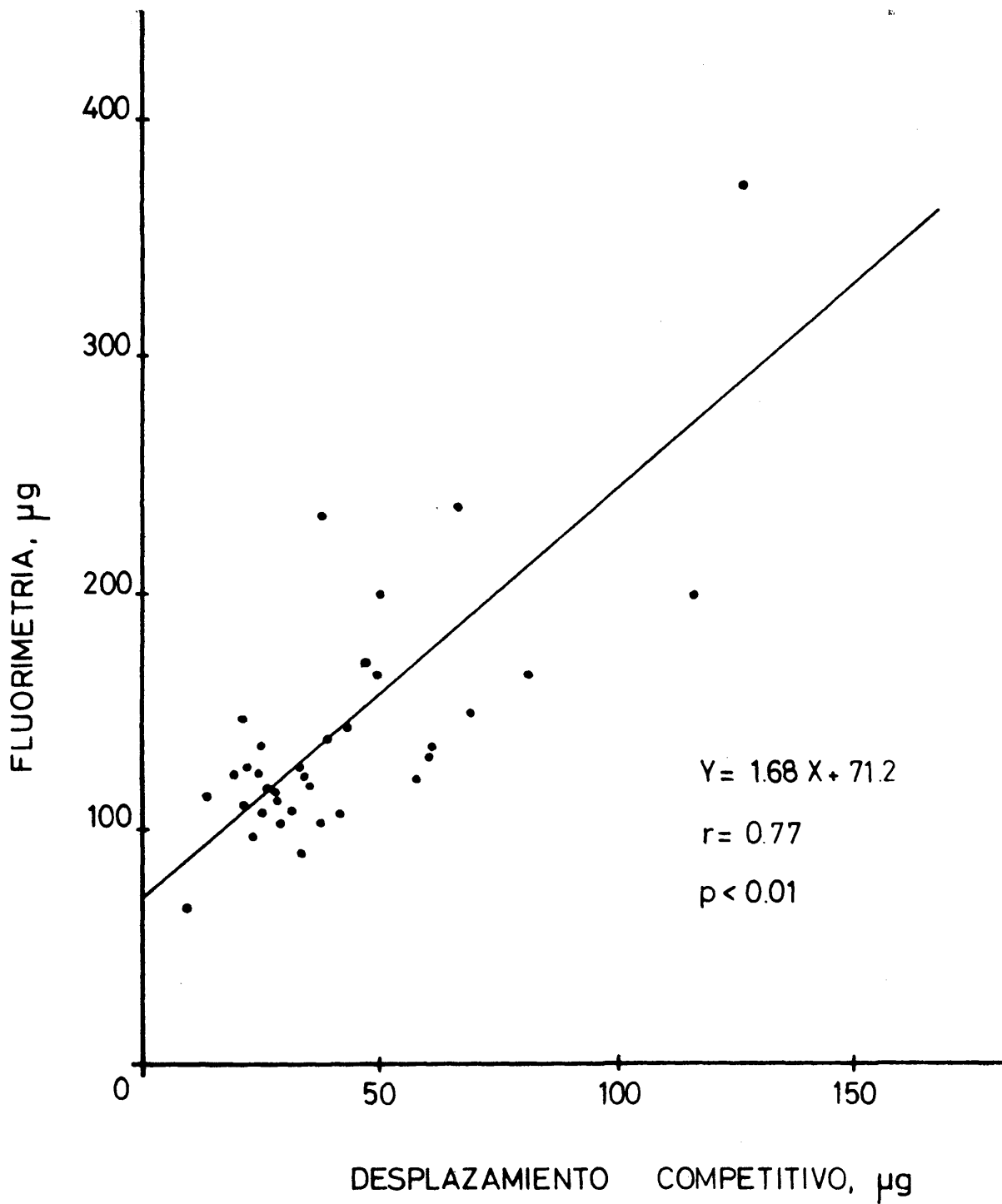


FIG. 26.- Potencia relativa de seis esteroides diferentes para competir frente a cortisol en el analisis por CPB. F = cortisol, E = cortisona ; P = progesterona ; 17-OH P = 17 α -hidroxiprogesterona; B = corticosterona ; DOC = deoxicorticosterona; S = 11-deoxicortisol.



(n = 28)

FIG. 28.- Correlacion entre 11-hidroxicorticoides plasmáticos de terminados mediante la técnica fluorimétrica de Mattingly y corticosteroides en plasma determinados mediante CPB ($\mu\text{g}/100 \text{ ml.}$)



(n = 35)

FIG. 29.- Correlacion entre 11-hidroxicorticoides y corticosteroides libres en orina determinados mediante las técnicas antes mencionadas ($\mu\text{g}/24$ horas).

Cortisol en plasma, g/100 ml.					
NOMBRE	Basal (9.00 hr.)	Post - ACTH			
		30 min.	60 min.	120 min.	240 min.
L B D	13	31	35	34	24,5
J A S	20	31	39	60	37
F D D	11	32	36	32	29
J L G	23	33	41	36	17
A J M	10	24	34	-	18
G R R	14	23	35	32	20
L E V	9	32	48	40,5	25
S C P	16	30	39	45	22
L M R	7	20	36	40	28
J M R	10	28	38	40	-
Media	13,3	28,6	38,1	39,9	24,5
D S	5,07	4,11	4,12	8,7	6,26

TABLA 35.- Valores de cortisol plasmático basales y tras el estímulo con 0,25 mgr. de NUVACTHEN en 10 sujetos normales observados por el método de CPB.

NOMBRE	B	P.N.	R	P.DXM.	C.D.	DIAGNOSTICO
A. P.O.	26	81	18.5	18.5	1545	ADENOMA
"	17.5	55.5	23	-	-	"
M. J. M.	8	16.5	9	-	-	ADENOMA
"	22	24	17	22.5	665	"
J. J. M.	20.5	30	17	18.5	235	CARCINOMA
A. V. H.	11.5	33.5	8.5	12	175	HIPERPLASIA
A. M. G.	12.6	32.5	10	-	316	HIPERPLASIA

TABLA 36.- Valores de cortisol en plasma basales y en las diferentes pruebas y de cortisol libre en orina, medidos por C.P.B. en 5 sujetos afectados de síndrome de Cushing.

V.- Discusion de los resultados obtenidos

V.1.- Estudios sobre la valoración clínica de la cinética de la respuesta a un octadecapeptido de síntesis.

V.1.1.- Niveles basales de la poblacion experimental utilizada

Los valores basales de 11-OH-CS del conjunto de individuos en los distintos días (tabla 10, columnas), muestran unos valores medios (\bar{x}) e índices de dispersion (C.V) semejantes. Parecen existir patrones individuales, pues el sujeto C.H.O. presenta sistemáticamente los valores basales mas bajos y el sujeto M.A.E. los más altos.

V.1.2.- Respuesta máxima al β^{1-24} A.C.T.H.

Se ha afirmado que 250 μ gr de tetracosactido sintético son capaces de inducir una respuesta adrenal máxima GREIG y Col. (1968). Se toma en los test de función adrenal, según los grupos británicos mas prestigiosos, la respuesta a los 30' de la administración del tetracosactido, como índice de la respuesta adrenal, por el intervalo de tiempo para el que esta respuesta es mas reproducible. Estos datos no coinciden exactamente con los aquí aportados (tabla 11), en donde la respuesta máxima se consigue a los 60'. Si bien es verdad que la desviación standard en los valores observados, es ligeramente menor a los 30' ($\sigma = 6,6$) que a los 60' ($\sigma = 8,2$), las diferencias entre los valores encontrados son a veces notables y dignas de ser tenidas en cuenta (sujetos 5 y 9).

Hay que destacar que nosotros administramos el tetracosactido endovenosamente, mientras que los británicos lo hacen intramuscular y si este polipeptido tiene una dinámica similar al del C-41795-Ba, que discutiremos más adelante, la acción sobre la suprarrenal puede prolongarse por esta primera vía.

De acuerdo con GREIG y Col. (1968) mayores dosis del tetracosactido (NUVACTHEN) no consiguen incrementar la respuesta adrenal (Fig. 10) y si bien el efecto al administrarlo por vía i.v. es más sostenido que por vía i.m. (diferencias significativas a los 240', tabla 14), los incrementos máximos obtenidos por ambas vías son del mismo rango, observándose menor dispersión en las respuestas por vía i.m. (tablas 11 y 13).

V.1.3.- Respuesta comparada entre β^{1-24} ACTH y D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸ - β^{1-18} , ACTH

Pese a estar utilizándose dosis farmacológicas y no fisiológicas tanto del NUVACTHEN como del C-41795-Ba, con el NUVACTHEN, no se consiguen estímulos máximos de la glándula adrenal, en contraposición con lo aportado por GREIG y Col. (1968). Parece ser que el estímulo con NUVACTHEN tiene un límite de saturación, por lo que dosis mayores de 0,25 mgr de este producto no consiguen una mayor respuesta adrenal.

La molécula de D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸ - β^{1-18} -ACTH capaz de unirse a los receptores adrenales y estimular su función

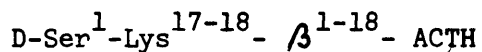
esteroidea, quedará protegida parcialmente de las enzimas que en la adrenal inactivan la molécula de β^{1-24} ACTH. Por otra parte el hecho de que esta acción, sea no solo mas prolongada, sino también creciente, en relacion con la acción del tetracosactido (Fig. 13) parece indicar no solo una mas lenta degradación "in situ" sino también una mayor persistencia del octadecapeptido en el compartimento plasmático (es decir con tiempo de vida media mayor) , y es por lo tanto, capaz de tener estimulada la glandula suprarrenal por encima de los valores máximos que se alcanzan con 1 mgr. de NUVACTHEN durante mas de 24 horas.

V.1.4.- Efecto de la via de administración del polipéptido

D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{1-18} -ACTH

La via intravenosa consigue un efecto estimulante mas prolongado sobre la glandula adrenal que la intramuscular o subcutanea (Fig. 14). Este hecho unicamente puede interpretarse en relación con la degradación que las diferentes enzimas tisulares realizan en el producto administrado, de forma que pese a administrar en los tres casos 1 mgr. de octadecapeptido, presumiblemente al compartimento plasmático llegan 1 mgr. por la primera via (i.v.) y cantidades menores por las otras dos vias (i.m. e i.v.) por lo tanto parte del compuesto ha sido anactivado entre el punto de administración y su ingreso en el compartimento plasmático.

V.1.5.- Efecto de dosis decrecientes del polipeptido



En la Fig. 15 podemos observar la cinética de las respuestas a las distintas dosis. La dosis de 0,125 mgr. del octadecapeptido a las ocho horas de su administración ha perdido toda acción sobre la glandula adrenal. Esta es la dosis de elección si queremos estandarizar la prueba de estimulación-ritmo-supresión, como hasta la fecha se realiza con el β^{1-24} ACTH (NUVACTHEN). Dosis mayores que esta dan a las ocho horas valores mas altos que son esta disticamente significativos (tabla 22). Si lo que deseamos es un efecto mas prolongado sobre la glandula, hemos de utilizar dosis de 0,5 o 1 mgr., con las cuales una administración cada 12 horas, nos permite un estimulo prolongado de la glandula.

V.1.6.- Medida de la respuesta adrenal por la excrección urinaria de 17-KS y T-17-OH-CS

La administración de 0,25 mgr. o 1 mgr. del tetra-
cosactido, no modifica significativamente la excrección
urinaria de 17-KS y T-17-OH-CS (Fig. 16), debido a la
corta acción del β^{1-24} ACTH (4 horas) sobre la glandula
adrenal. La acción mas sostenida del D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸-
- β^{1-18} -ACTH, si modifica esta excrección (tablas 25, 26,
27, Fig. 17) como ya habiamos observado para los valores
de 11-OH-CS plasmáticos. El hecho de que las diferencias

de los valores de 17-KS no sean significativas, no debe de extrañarnos, por cuanto, la dosificación de estos metabolitos no es un buen índice de la función adrenal, las gonadas participando en mayor proporción a la excrección de 17-KS que de 17-OH-CS urinarios, son una notable fuente de variación. Conociéndose además que la función testicular endocrina depende, entre otros factores de la actividad sexual (BLISS, E. L. (1972)) y dada la edad de los sujetos experimentales y el hecho de no haber realizado ninguna medida restrictiva al respecto, es obvio, que de los valores de los 17-KS, se pueda obtener poca información acerca del funcionalismo adrenal.

V.1.7.- Correlación entre valores basales de 11-OH-CS plasmáticos y 17-OH-CS urinarios

El coeficiente de correlación obtenido $r = 0,017$ no es estadísticamente distinto de cero, no existe pues dependencia estocástica entre estas variables. Este resultado constata el hecho conocido de que los 11-OH-CS plasmáticos y 17-OH-CS urinarios miden parametros diferentes del funcionalismo adrenal.

V.1.8.- Correlación entre secreción adrenal y 17-OH-CS urinarios

COPE y BLACK (1958), demuestran que existe una buena correlación entre la tasa de secreción adrenal diaria de cortisol medida por métodos isotópicos y la excrección diaria de esteroides 17-cetogenicos, de forma que estos últimos representan aproximadamente un 50 % de la secreción diaria de cortisol.

La estimación que hacemos de la tasa de secreción adrenal de cortisol, es desde luego, solo aproximada, pero como puede observarse hemos obtenido una correlación positiva ($r = 0,566$) y distinta de cero a $p < 0,01$.

V.2.- Analisis de los valores de 11-OH-CS plasmáticos en una población "control" hospitalaria.

V.2.1.- Basales y distribución por sexos y edades

Los valores obtenidos en los 611 muestras de plasma nos dan una media de 16,40 $\mu\text{gr}/100$ ml. con un rango de 6 a 29 $\mu\text{gr}/100$ ml. con un coeficiente de riesgo $p < 0,05$.

Comparadas con los datos obtenidos de la literatura (tabla 37), observamos que excepto en un caso son ligeramente superiores.

T A B L A 37

Concentración media normal en plasma de 11-OH-CS en $\text{gr}/100$ ml.

MATTINGLY (1962)	15
BRAUNSBURG y JAMES (1962)	11,2
DENNIS (1963)	15,2
VERMEULEN y Col. (1964)	14,6
SPENCER-PEET y Col. (1965)	9,7
STAHL y DORNER (1965)	9,5
TARQUINI y TOCCAFONDI (1965)	17,2

Esto no nos extraña, por cuanto:

- 1º) La población no ha sido (a propósito) seleccionada entre un conjunto de individuos absolutamente normales, fundamentalmente en lo que se refiere al sobrepeso. Sabido es, que en los obesos la concentración de 11-OH-CS plasmáticos es ligeramente superior a la de los individuos sin exceso de peso. Pero intentábamos establecer unos rangos perfectamente utilizables para una población heterogénea sin patología adrenal, hepática o renal.
- 2º) Los valores obtenidos dependen del método utilizado, nosotros utilizando métodos de saturación (C.P.B.) que son más específicos para la dosificación del cortisol plasmático, hemos obtenido valores más bajos ($\bar{x} = 13,3 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$).
- 3º) El estudio estadístico exhaustivo realizado, nos indicó que la distribución de valores de 11-OH-CS plasmáticos basales no era Gaussiana y para calcular el rango ($6-29 \mu\text{gr}/100 \text{ ml}$.) se ha utilizado el método de Wilks, que determina un rango mayor (aunque más fiable) que la técnica paramétrica.

En cuanto a la distribución por sexos y edades, nuestros resultados coinciden con los de la literatura (BLISS y Col. (1965), WEST y Col. (1961)), en el sentido de no encontrar diferencias.

V.2.2.- Estimulación con el β^{1-24} ACTH

La respuesta a la administración de 0,250 mgr. de

β^{1-24} ACTH (NUVACTHEN), nos da un rango de valores mayor que el encontrado por GREIG y Col. (1968) de (24 - 51) $\mu\text{gr}/100$ ml. frente a (18 - 47 $\mu\text{gr}/100$ ml) , de la misma forma hemos comprobado que en sujetos "normales" cuanto menor es el valor basal, mayor es el incremento obtenido en la administración de β^{1-24} ACTH, lo que nos indica una mayor reserva adrenal. Abundando en lo apuntado en el apartado anterior, creemos que nuestros datos son más fiables, por no ser una población rigidamente seleccionada, por el buen tamaño de la muestra elegida (n = 149) y por la mayor fiabilidad de las pruebas estadísticas utilizadas.

El estudio de los incrementos relativos, respecto al valor basal, creemos sin embargo, no aporta datos muy interesantes para el manejo de rutina de esta prueba y son preferibles los datos absolutos, como modernamente se realiza por los distintos autores. El test de estimulación se considera positivo (GREIG y Col. 1967)).

- a) El incremento a los 30' es mayor de 7 $\mu\text{gr}/100$ ml.
- b) El nivel alcanzado a los 30' debe ser mayor de 18 $\mu\text{gr}/100$ ml.

Las cifras por nosotros obtenidas en la aplicación de esta prueba, confirman los criterios anteriores.

V.2.3.-Estudio del ritmo espontaneo de secreción

Los valores encontrados en la literatura, para caracterizar el ritmo espontaneo de secreción de cortisol

plasmático (11-OH-CS) son:

- a) valores a las 9 a.m. (6-26) $\mu\text{gr}/100\text{ ml}$
- b) valores a las 6 a.m. $< 15\ \mu\text{gr}/100\text{ ml}$
- c) valores a las 24 h, $< 8\ \mu\text{gr}/100\text{ ml}$.

En el estudio realizado por nosotros hemos tomado la muestra a las 20 h. aproximadamente, encontrando un rango de (3-14) $\mu\text{gr}/100\text{ ml}$. que coincide aceptablemente con los datos anteriores.

De forma analoga al estudio anterior hemos demostrado que cuanto mayor sea la cifra basal, mayor es el decremento absoluto obtenido, comparando esta con el valor correspondiente a las 20 h. En la fig. 115, queda reflejado este hecho al representar un valor (9 a.m.) frente a otro (20 h.).

V.2.4.- Inhibición con Dexametasona

La prueba rápida de inhibición administrando a las 23 h. 1 mgr de Dexametasona, nos aportó un valor medio a las 9 a.m. del día siguiente de $\bar{x} = 4,11\ \mu\text{gr}/100\text{ ml}$. La corta serie estudiada ($n = 70$), no nos permitió aplicar los métodos no paramétricos, para determinar el rango, no obstante el mayor valor alcanzado en nuestra serie fue de $10,2\ \mu\text{gr}/100\text{ ml}$. que correspondía a un valor basal de $27\ \mu\text{gr}/100\text{ ml}$., creemos por lo tanto que el valor aportado por la literatura por el que se considera como positiva la supresión en el valor alcanzado en menos de $8\ \mu\text{gr}/100\text{ ml}$. es excesivamente bajo o por el contrario

1 mgr de dexametasona no consigue suprimir en todos los sujetos la actividad glandular y es preferible como hacen otros autores , administrar 0,5 mgr cada 6 horas durante 48 horas.

V.3.1.- Discusión del método analítico por C.P.B. de cortisol en plasma y orina

La determinación de las concentraciones plasmáticas de cortisol constituye un parámetro de notable interés clínico, por lo que la demanda del mismo ha ido incrementándose en los últimos años. Aunque en el curso de la última década, los métodos fluorimétricos han satisfecho en general las exigencias clínicas, parece de interés la puesta a punto de técnicas que permitan reducir los volúmenes de la muestra biológica necesaria así como aumentar el rendimiento analítico de trabajo en el laboratorio.

El procedimiento de extracción utilizado es, básicamente, idéntico para el método fluorimétrico y por CPB aunque al utilizar menor volumen de muestra biológica, permite reducir a escala el material de vidrio y el consumo de solventes utilizados. La extracción con diclorometano difiere de la originalmente propuesta por MURPHY y Col. (1963) consistente en una precipitación de las proteínas plasmáticas con etanol. Ambas recuperan cuantitativamente el F-H³ y mientras el diclorometano, siendo mas volátil, facilita su secado y no exige la centrifugación para sepa

rar el precipitado proteico, el etanol en cambio, ofrece la ventaja de ser mas facilmente pipeteado con los dispensadores manuales de volumen fijos. En nuestro caso, hemos unificado el procedimiento de extracción para plasma y orina puesto que a partir de ésta última, el uso del etanol no es posible con nuestro método.

La incubación del extracto con la solución CBG-H³-F durante 10 minutos a 37°C y durante 30 minutos adicionales a 4°C parecen ser suficientes para alcanzar una situación proxima al equilibrio del sistema. El acortamiento de dichos periodos de incubación, aunque posible, requiere un control riguroso del tiempo. La prolongación, en cambio, del periodo de incubación a 4 °C, no afecta sensiblemente los resultados obtenidos.

Para la separación de las fracciones de esteroide libre y unida a la CBG, hemos preferido la utilización de carbón-dextrano frente a otras posibles alternativas. Con respecto a los procedimientos originales de filtración en gel, ABRAHAN, (1969) y dialisis, MURPHY y Col. (1963). la elección es obvia por razones practicas de mayor rapidez y simplicidad. El uso de Fluorisil, utilizado por otros autores, MURPHY, B.E.P. (1967), COPE y Col. (1968), HSU y BLEDSOE, (1970) no es, en nuestra experiencia, satisfactorio por la obtención de resultados poco reproducibles. Otro procedimiento utilizado es la precipitación de la fracción unida con sulfato amónico COX y GUNCEN, (1973), que

ofrece la ventaja de poder contar tanto dicha fracción unida como la libre, siendo igualmente un medio rápido y sencillo de separación.

Dado que la separación mediante carbón-dextrano de las fracciones de esteroide libre y unido a C.B.G. se realiza en condiciones de no-equilibrio del sistema, es importante controlar rigurosamente el tiempo de permanencia de dicha suspensión de carbón-dextrano con la mezcla de incubación (Fig. 30), así como realizar dicha generación manteniendo la temperatura a 2-4 °C, con lo que la disociación esteroide-C.B.G., es menor. Es igualmente necesario, determinar experimentalmente la capacidad de cada lote de carbón para adsorber el esteroide libre, utilizando la cantidad mas idónea en cada caso.

La utilización de C.B.G. como "proteína captadora" presenta el inconveniente de su falta de especificidad, como se evidencia en la tabla 34 y fig. 26. Este inconveniente es compartido por razones distintas por los métodos fluorimétricos, que detectan todos los compuestos con un grupo -OH en posición 11 β , además del cortisol. Sin embargo, considerando las concentraciones fisiológicas de los corticosteroides que se cuantifican con el C.P.B. como "cortisol", y con la excepción de la corticosterona, todos están presentes en concentraciones tan pequeñas que son negligibles a fines prácticos con relación a las de cortisol (tabla 38).

Por otro lado, muchos de estos compuestos modifican sus concentraciones plasmáticas paralelamente a las de cortisol frente a estímulos diversos. En función de estos hechos, los métodos fluorimétricos han encontrado gran aceptación a pesar de que aproximadamente el 10 % de la fluorogenicidad medida no es atribuible al cortisol JAMES y Col. (1968). De igual forma, la relativa falta de especificidad de los métodos por C.P.B. no constituye una limitación seria a su utilización con fines clínicos. Para estudios que requieran una mayor especificidad, esta se consigue introduciendo uno o dos pasos de separación cromatográfica previamente al análisis por desplazamiento. Otra alternativa, sin duda mucho mas ventajosa, la constituye el uso de antisueros específicos que hacen innecesaria la purificación previa al análisis. VECSEI y Col. (1972), FARMER y Col. (1974).

La correlación obtenida para las muestras de plasma con el método de Mattingly y su practicamente, idéntica magnitud, permiten cambiar de metodología sin el tedioso proceso de modificar los hábitos clínicos en la interpretación de resultados. Por el contrario, el método por C.P.B. es más específico aplicado a valoraciones urinarias. Considerando el interés de la determinación de cortisol libre en orina para el diagnóstico de los hipercorticismos, creemos que es mas ventajoso y fiable el C.P.B. que la fluorimetría cuando se aplica a dichas determinaciones urinarias.

V.3.2.- Discusión de los resultados obtenidos con este método.

Estudiando los datos de la tabla 36, observamos que excepto para el primer enfermo (A.P.O.), los valores de cortisol plasmático basales y después del estímulo con NUVACTHEN son absolutamente normales, así como el estudio del ritmo espontáneo (20 horas) en tres de terminaciones. Todas las determinaciones de cortisol libre en orina están muy por encima del nivel normal ($> 100 \mu\text{gr/día}$), así como el estudio en plasma de la prueba de supresión con dexametasona.

Estos resultados confirman una vez más el valor de la determinación de cortisol libre urinario, en el diagnóstico de los hipercorticismos.

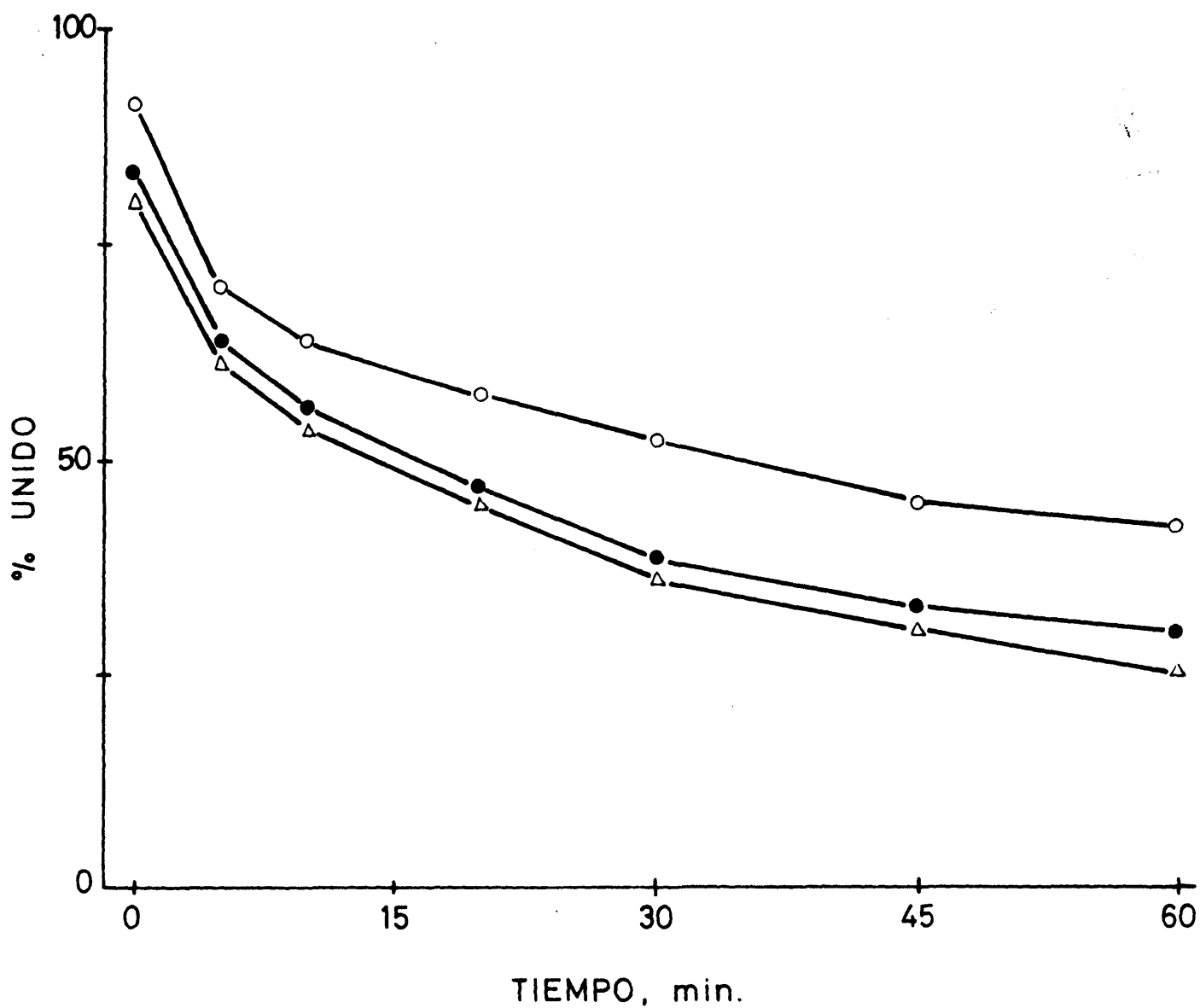


FIG.30.- Efecto del tiempo de permanencia con el medio de incubación y del volumen de la suspensión de carbón (0,5 %)-dextrano (0,05 %)añadido en el analisis por CPR. (o...o) 100 µl; (●---●) 200 µl; (Δ---Δ) 300 µl/tubo. Temperatura 2-4°C.

Esteroides	Método	Conc. Plasmática (Rango)	Autor
Cortisol	CPB	6 - 18	1967 Murphy
	DDI	3,1 - 20,8	1968 Fraser y Col
	CPB	5,6 - 14	1971 Fiorelli y Col.
	RIA	3,5 - 18	1974 Farmer y Pierce
	CPB	7 - 23	1975 Nosotros
Corticosterona	DDI	0,5 - 2	1967 Dixon y Col.
	DDI	0,13- 2,3	1968 Fraser y Col.
11-Deoxicortisol	CPB	1,0	1974 De la Pena y Goldzieher
Progesterona ^a	DDI	0,003 - 0,054	1965 Riondel y Col.
	GLC	0,015 - 0,048	1967 V. der Molen y Col.
	CPB	0,033 \pm 0,017 ^b	1970 Lipsett y Col.
	CPB	0,014 - 0,068	1972 Sasaki y Col.
17 α -Hidroxi progesterona ^a	CPB	0,095 \pm 0,06 ^b	1970 Lipsett y Col.
Deoxi- corticosterona	CPB	0,005 - 0,010	1971 Brown y Strett

DDI : Doble dilución isotópica

CLG : Cromatografía en fase gaseosa

RIA : Radioinmunoensayo

(a) : Concentraciones plasmáticas en varones normales

(b) : Media \pm DS

TABLA 38.- Concentraciones plasmáticas de los mas importantes glucocorticoides según diferentes metodos y autores.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados aportados anteriormente, podemos obtener las siguientes conclusiones:

- 1°.- Para una población control hospitalaria, sin alteraciones hepáticas, renales o endocrinas y no sometida a terapéutica con corticoides, el valor de los 11-OH-CS plasmáticos a las 9 a.m. tiene un rango de variación de 6 a 29 $\mu\text{gr}/100\text{ ml.}$ con un valor medio de 16,4 $\mu\text{gr}/100\text{ ml.}$ No existiendo diferencias entre sexos, ni entre distintos grupos de edad.
- 2°.- No existe correlación significativa entre los valores de los 11-OH-CS plasmáticos basales y los 17-OH-CS urinarios de 24 h.
- 3°.- La estimulación con 250 μgr de β^{1-24} corticotrofina, provoca en la muestra obtenida a los 60' de su administración, un incremento medio sobre el valor basal correspondiente del 225 % con un rango de variación del 30 % hasta el 317 %. El incremento es mayor cuanto menor sea el valor basal. Existiendo una correlación significativa ($r = 0,46$, $p < 0,01$) entre el incremento absoluto de la cifra de 11-OH-CS en plasma y el correspondiente valor basal.
- 4°.- Al ser tan amplio el rango de variación obtenido en el resultado de esta prueba, al expresar los valores en tanto por ciento del valor basal, creemos que este método no es de utilidad y debe volverse al método ya estandarizado que estudia el valor absoluto del incremento obtenido ($< 7\ \mu\text{gr}/100\text{ ml.}$)
- 5°.- Esta prueba por su falta de utilidad no debe ser aplicada a sujetos sospechosos de hipercorticalismo.

- 6°.- 250 μ gr de β^{1-24} corticotrofina, no constituyen un estímulo máximo para la corteza adrenal y no existen diferencias significativas (a los 30' y 60') en su administración por diferentes vías (i.v. e i.m.).
- 7°.- El estímulo con D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{1-18} ACTH sobre la corteza adrenal es mucho mas intenso y duradero que el estímulo con β^{1-24} corticotrofina, pese a utilizarse en ambos casos, dosis farmacológicas.
- 8°.- El tiempo de vida media del D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{1-18} ACTH es mayor que el del β^{1-24} corticotrofina, siendo el primero probablemente más resistente a la degradación por los enzimas que en la corteza adrenal degradan la molecula de β^{1-24} corticotrofina.
- 9°.- El octadecapeptido D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{1-18} ACTH tiene una actuación sobre la corteza adrenal mas duradera por via intravenosa que por las vias intramuscular o subcutanea, lo que condiciona mayor concentración de los 11-OH-CS plasmáticos al administrarlo por la primera via.
- 10°.- Una sola administración de 1 mgr. de D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{1-18} -ACTH por via endovenosa, permite tener estimulada la máximo la corteza suprarrenal, durante mas de 24 h.
- 11°.- La administración de dosis menores (500, 250 o 125 gr) de D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β^{1-18} -ACTH permite modular el tiempo durante el cual deseamos tener estimulada la corteza adrenal.
- 12°.- La administración de una sola dosis de 1 mgr. de β^{1-24} corticotrofina, no consigue variar significativamente la excrección urinaria de 17-KS y 17-OH-CS correspondiente al día de la administración.

- 13°.- La administración por las tres vías (i.v., i.m. y s.c.) de D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β ¹⁻¹⁸-ACTH consigue incrementar significativamente la eliminación de los 17-OH-CS (totales) urinarios correspondientes al día de la administración y para la vía i.v. también los del día siguiente.
- 14°.- Los 17-KS en sujetos adultos sanos, no son un buen índice de la función adrenal.
- 15°.- Existe una buena correlación entre la eliminación de los 17-OH-CS urinarios de 24 h. y el área encerrada entre la curva de concentraciones plasmáticas de 11-OH-CS y la ordenada correspondiente al valor basal, al administrar 1 mg. de D-Ser¹-Lys¹⁷⁻¹⁸- β ¹⁻¹⁸-ACTH por las tres vías ($r = 0,566$; $p < 0,01$).
- 16°.- El estudio del ritmo espontáneo de secreción, es una buena prueba en el diagnóstico de los síndromes de hipercorticalismo autono. Es preferible utilizar el criterio de los valores absolutos, que no, el de los tanto por ciento del valor basal, por la gran variabilidad que en este último encontramos (45 % valor medio con un rango del 12 al 75 %). Debiendo realizarse la determinación, en una muestra tomada a las 23 h.).
- 17°.- La prueba de supresión con 1 mgr. de dexametasona se ha mostrado eficaz en los casos de hiperfunción (tabla 36) pero en sujetos normales, hemos obtenido valores más altos que los descritos en la literatura, quizás, porque la prueba deba realizarse como aconseja LIDDLE, administrando 0,5 mgr. cada 6 h. durante 48 horas.
- 18°.- Existe una buena correlación entre 11-OH-CS plasmáticos, medidos

por fluorimetría y corticosteroides, medido por C.P.B. Esta correlación no es tan buena, aunque sigue siendo estadísticamente significativa, para los valores correspondientes en la orina.

19°.- El estudio del cortisol libre urinario, medido por C.P.B. es el método de elección para el diagnóstico de los Hiper corticalismos.

BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, G. E.:

Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . - J. Clin. Endocrinol. Metab., 29, 866, 1969.

ADDISON, Thomas:

On the Constitutional and Local Effects of Disease of the Suprarenal Capsules.- London: S. Highley, 1855

APPLEBY, J. I., GIBSON, G., NORZYMBERSKI, J. K. and STUBBS, R. D.

Indirect analysis of corticosteroids. I. The determination of 17-hydroxycorticosteroids.-Biochem. J., 60, 453. (1955)

BEARDWELL, C. G., BURKE, C. W. and COPE, C. L.

Urinary free cortisol measured by competitive protein binding.- J. Endocro., 42, 79. (1968).

BEITLINS I. Z., SHAW, M. H., KOWARSKI, A and MIGEON, C. J.

Comparison of competitive protein binding radioassay of cortisol to double isotope dilution and Porter-Silber methods.- Steroids, 15, 765 (1970)

BELL, P.H., HOWARD, K. S., SHEPHERD

Studies with corticotrophin II. Pepsin degradation of corticotrophin J. Am. Chem. Soc. 78, 5059-66 . (1956)

BIRKE G., DICZFALUSY, E. and PLANTIN, L-O

Assessment of the functional capacity of the adrenal cortex. I. Establishment of normal values. J. Clin. Endocr., 18, 736. (1958)

BLISS, E. L. SANDBERG, A. A., NELSON, D. H. and EIK-NES, K.

The normal levels of 17-hydroxycorticosteroids in the peripheral blood of man. J. Clin. Invest., 32, 818. (1953)

- BLISS, E. L.
Brain and testicular function.- *Life Sciences*, 11, 231. (1972)
- BONGIOVANNI, A. M., EVERLEIN, W. R., and THOMAS, P. Z.
Use of an organic base in the Zimmermann reaction.- *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 17, 331. (1957)
- BRICAIRE, H. and LAURENT, D.
Un test de frenation rapide de l'axe hypophyso-surrenal. *Ann. Endocr. (Paris)* 28, 65. (1967)
- BROOKS, C. J. W. and NORBYMERSKI, J. K.
The oxidation of corticosteroids with sodium bismuthate.- *Biochem. J.*, 55, 371. (1953)
- BROWN-SEQUARD, C. E.
Recherches experimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrenales.- *Compt. Rend.* 43 : 422-425, (1856)
- BROWN, R. D., STROTT, C. A.
Plasma deoxicorticosterone in man.- *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 32, 744 (1971)
- CALLOW, N. H., CALLOW, R. K. and EMMENS, C. W.
Colorimetric determination of substances containing the grouping CH_2CO in urine extracts as an indication of androgen content.- *Biochem. J.*, 32, 1312.- (1938)
- COPE, C. L. and HURLOCK, B.
Some aspects of adrenal cortical metabolism.- *Clin. Sci.*, 13, 69 (1954)
- COPE, C. L. and HARRISON, R. J.
Effect of 9 α -fluoro hydrocortisone on adrenal hyperfunction in Cushing's syndrome.- *Brit. Med. J.*, 2, 457. (1955).
- COPE, C. L.
Diagnostic use of adrenal inhibition in Cushing's syndrome.- *Brit. Med. J.* 2, 193. (1956)

COPE, C. L. and BLACK, E.

The reliability of some adrenal function tests.- Brit. Med. J.,
2, 1117 (1959)

COPE C. L.

Adrenal steroids and disease.- Ed. Pitman and Sons Ltd. (London) (1972)

CORI, C. F. and G. T. CORI

The fate of sugar in the animal body. VII. The carbohydrate
metabolism of adrenalectomized rats and mice.- J. Biol. Chem.
74: 473-494, (1927)

COX, R. A., GUKCEN, M.:

A modified competitive protein binding determination for cortisol.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 37, 670, (1973)

DE LA PENA, A., GOLDZIEHER, J. W.

Practical determination of total plasma cortisol by use of competitive
protein binding.- Clin. Chem., 20, 1376, (1974)

DE MOOR, P., STEENO, O., RASKIN, M. and HENDRIKX, A.

Fluorimetric determination of free plasma 11-hydroxycorticosteroids
in man.- Acta Endocr. (Kbh), 33, 297 (1960).

DENNIS, P. W.

The determination of free plasma cortisol.- N. Z. Med. J., 62, 478
(1963)

DICZFALUSY, E., PLANTIN, L-O., BIRKE, G., INGALL, S. C. and NORZYMBERSKI, J.K.

The quality of sodium bismuthate as a factor affecting the determina-
tion of urinary 17-hydroxy corticosteroids.- Acta Endocr. (Kbh.),
27, 275 (1958)

DIXON, P. F., BOOTH, M., BUTLER, J.

The corticosteroids. En "Hormones in blood". Eds. C. H. Gray and
A. L. Bacharach. 306, Academic Press. New York, Londres (1967)

- ENGEL, E., HELMREICH, M. L., HERTOGHE, J. and BORTH, R.
Variations du taux plasmatique des 17-hydroxycorticosteroids au cours du nythemere et apres administration d' ACTH.- Semaine Hôp. Paris, 31, 70 (1955)
- FARMER, R., PIERCE, C. E.
Plasma cortisol determination : Radioimmunoassay and competitive protein binding comparad.- Clin. Chem., 20, 411. (1974)
- FEW, J. D.
A method for the analysis of urinary 17-hydroxycorticosteroids.- J. Endocr., 22, 31. (1961)
- FIGURELLI, G., PIOLANTI, P., FORTI, G., SERIO, M.,
Determination of plasma corticosteroids and urinary cortisol by a competitive protein-binding method using dextran-coated charcoal. Clin. Chim. Acta, 37, 179. (1972)
- FLEISCHER, N., GIVENS, J. R., ABE, K., NICHOLSON, W. E. and LIDDLE, G. W.
Studies of ACTH antibodies and their reactions with inactive analogues of ACTH.- J. Clin. Invest., 44, 1047-8 (1965)
- FRANKEN, F. H. and ZIMMERMANN, H,
Aldosteron, Cortisol und Cortison im Harn und in operativ entfernten Nebennieren bei Patienten mit Cushing syndrom.- Acta Endocr. (Kbh.) 41, 531 . (1962)
- FRASER, R., JAMES, V. H. T.
Double isotope assay of aldosterone, corticosterone and cortisol in human peripheral plasma.- J. Endocrinol., 40, 59, (1968)
- GEMZELL, C. A.
Methods of estimating corticosteroids in plasma.- Acta Endocr. (Kbh) 18, 342 (1955).
- GRAY, C.H., BARON, D.N., BROODS, R.V., and JAMES, V.H.T.
A critical appraisal of a method of estimating urinary 17-oxosteroids and total 17-oxogenic steroids. Lancet 1, 124, (1969)

- GREIG, W. R., BOYLE, J. A., JASANI, M.K. and MAXWELL, J. D.
Corticotrophin stimulation tests.- (Abst.) Proc. roy. Soc. Med.
60, 908. (1967)
- GUILLEMIN, R., CLAYTON, G. W., LIPSCOMB, H. S. and SMITH, J. D.
Fluorometric measurement of rat plasma and adrenal corticosterone
concentration. A note on technical details.- J. Lab. Clin. Med.
53, 830 (1959)
- HALBERG, F.
Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations
with reference to the adrenal cycle.- Z. Vitamin Hormon. Ferment-
forsch., 10, 225. (1959)
- HARTMAN, F. A., C. G. MAC ARTHUR, and W. E. HARTMAN.
A substance which prolongs the life of adrenalectomized cats.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 25 : 69-70 (1927)
- HARTMAN, F. A., K. A. BROWNELL, and W. E. HARTMAN
A further study of the hormone of the adrenal cortex.- Am. J. Physiol
99: 670-680. (1930)
- HELLMAN, L., WEITZMAN, E. D., FUKUSHIMA, D., NOGEIRE, C.
Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in
normal subjects.- J. Clin. Endocr. 33, 14 (1971)
- HENCH, P. S., E. C. KENDALL, C. H. SLOCUMB, and H. F. POLLEY.
The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-
dehydrocorticosterone (Compound E)) and of pituitary adrenocorti-
cotropic hormone on rheumatoid arthritis.- Proc. Staff Meeting
Mayo Clinic 24: 181-197 (1949)
- HENRY, R. J.
Clinical chemistry. Principles and Technics.- Hoeber, New York,
N. Y., 364 (1964)

HSU, T.H. and BLEDSOE, T.

Measurement of urinary free corticoids by competitive protein-binding radioassay in hypoadrenal states.- J. Clin. Endocr., 30 443. (197))

INGLE, D. J., and E. C. KENDALL

Atrophy of the adrenal cortex of the rat produced by the administration of large amounts of cortin.- Science 86 : 245. (1937)

ITURZAETA, N. F., HILLMAN, D. A. and COLLE, E.

Measurement of plasma cortisol in children and adults: a comparison of the double isotope derivative. (1970)

JAILER, J. W., LOUCHART, J., GOLD, J. J. and KNOWLTON A. I.

Effect of cortisona on urinary excretion of 17-ketoesteroids in patients with Cushing's syndrome.- J. Clin. Invest. 32, 449 (1953)

JAMES, V. H. T., TOWNSEND, J. and Fraser, R.

Comparison of fluorimetric and isotopic procedures for the determination of plasma cortisol.- J. Endocr., 37, 28 (Proc.) (1967)

JAMES, V. H. T., LANDON, J., FRASER, R.

The investigations of hypothalamic-pituitary-adrenal function.- Memories of the Society for Endocrinology. Eds. V.H.T. James and J. Landon. p. 141. Cambridge University Press. Cambridge (1968)

JENNY, P. M., MULLER, A. F. and MACH, R. S.

Effets cliniques et metaboliques d' un nouveau polypeptide a action adrenocorticotrope.- Schweiz, Wschr. 23 766-9 (1963)

KENDALL, E. C.

A chemical and physiological investigation of the suprarenal cortex. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Edited by Long Island Biological Association. Long Island, N. Y. Darwin Press, 1937, vol. v.p. 299-312.

KENDALL, E. C.

The chemistry and partial synthesis of adrenal steroids.-
Ann. N. Y. Acad. Sci. 50 : 540-547, (1949)

KENDALL, J. W., EGANS, M. L. and STOTT, A. K.

Fluorimetric determination of corticosteroids: an interfering
substance in impure dichloromethane which fluoresces with benzyl
alcohol preservative in heparin.- J. Clin. Endocr., 28, (1973)

KRIEGER, D., ALLEN, W., RIZO, F., and KRIEGER, H.

Characterization of the normal temporal Pattern of plasma
corticosteroid levels.- J. Clin. Endocr. 32 : 266,(1971)

KRUGER, F. A., WIELAND, R. G., MAYNARD, D. E., SCHACHNER, S. H. and
HAMWI, G. J.

Comparison of fluorimetric corticoids and Porter-Silber
17-hydroxycorticoids during fasting.- Metabolism, 14 199 (1965)

LANDON, J., JAMES, V. H. T., CRYER, R. J., WYNN, V and FRANKLAND, A.W.
Adrenocorticotropic effects of a synthetic polypeptide- G^{1-24} -
corticotropin on man.- J. Clin. Endocr., 24, 1206. (1964)

LIDDLE, G. W.

Test of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis
of Cushing's syndrome.- J. Clin. Endocr. 20, 1539 (1960)

LIPSETT, M. B., DOERR, P., BERMUDEZ, J. A.

Saturation assays for plasma progesterone and 17-hydroxyprogesterone.
En "Steroid assay by protein binding". 2nd. Karolinska
Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology.
Ginebra, 1970. Ed. E. Diczfalusy, pag. 155. Bogtrykkeriet Forum
Copenhagen, (1970)

LORIOUX, D. L., GUY, R., LIPSETT, M. E.

A simple quick, solid-phase method for radioimmunoassay of plasma
estriol in late pregnancy and of plasma cortisol. J. Clin. Endocr.
Metab., 36, 788 (1973)

LURIE, A. O.

Plasma cortisol assay: interference by spironolactone.-
J. Amer. Med. Ass. 211, 1850 (1970)

MANCHEÑO, E. B. MORENO, A. ALONSO y S. PEREZ MODREGO

Excrección urinaria de cortisol libre en pacientes neoplásicos.
Comunicación presentada al II Congreso Nacional de Endocrinología.
Las Palmas de Gran Canaria (1976)

MANN, H. B. and WHITNEY, D. R.

On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other.- Ann. Math. Statist. 18, 50-60 (1947)

MATTINGLY, D.

A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human plasma.- J. Clin. Path., 15, 374 (1962);

MOXHAM, A. and NABARRO, J. D. N.

Urinary flucocorticoid excretion.- J. Clin. Path., 9, 351 (1956)

MURPHY, B. E. P., ENGELBERG, W., PATTER, C. J.

Simple method for the determination of plasma corticoids.-
J. Clin. Endocrinol. Metab., 23, 293, (1963)

MURPHY, B.E.P.

Application of the property of protein-binding to the assay of minute quantities of hormones and other substances.- Nature, 291, 679 (1964)

MURPHY, B.E.P., PATTEE, C.J.

Determination of plasma corticoids by competitive protein binding analysis using gel filtration.- J. Clin. Endocrinol. Metab., 24 919 (1964)

MURPHY, B.E.P., HOOD, A.B. and PATTEE, C.J.

Clinical studies utilizing a new method for the serial determination of plasma corticoids.- Canad. Med. Ass. J., 90 , 775, (1964)

MURPHY, B.E.P.

Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro- and ultra micro- measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay.- J. Clin. Endocr., 27, 973. (1967)

MUNSON, P.L., GALLAGHER, T.F. and KOCH, F.C.

Isolation of dehydroisoandrosterone sulfate from normal male urine. J. Biol. Chem., 152, 67 (1944)

NEY, R.L., SHIMIZU, N., NICHOLSON, W.E., ISLAND, D.P. and LIDDLE, G.W.

Correlation of plasma ACTH concentration with adreno-cortical response in normal human subjects, surgical patients and patients with Cushing's disease.- J. Clin. Invest., 42, 1669 (1963)

NICHOLS, F., NUGENT, C.A. and TYLER, F.H.

Diurnal variation in suppression of adrenal function by glucocorticoids.- J. Clin. Endocr. 25, 343. (1965)

NORYMBERSKI, J.K.

Methods of Group Corticosteroid Estimation in Urine.
II. The Adrenal Cortex. Ed. McGowan, G.K. and Sandler, M.
(London Pitman Medical) p. 88 (1960)

NUGENT, C.A., NICHOLS, F and TYLER, F.H.

Diagnosis of Cushing's syndrome. Single-dose dexamethasone suppression test. Arch. Intern. Med. 116, 172 (1965)

NUGENT, C.A. and MAYES, D.M.

Plasma corticosteroids determined by use of corticosteroid-binding globulin and dextran coated charcoal.- J. Clin. Endocr., 26, 1116 (1966)

PFIFFNER, J.J.

The adrenal cortical hormones.- Advan. Enzymol, 2 : 325-356
(1942)

PINCUS, G.

A diurnal rhythm in the excretion of urinary ketosteroids by young men.- J. Clin. Endocr., 3, 195 (1943)

POKOLY, T.B.

The role of cortisol in human parturition.- Amer. J. Obstet. Gynecol., 117, 549. (1973)

RIONDEL, A., TAIT, J.T., TAIT, S.A.S., GUT, M., LITTLE, B

Estimation of progesterone in human peripheral blood using ³⁵S-Thiosemicarbazide.- J. Clin. Endocrinol. Metabol., 25 229. (1965)

ROGOFF, J.M. and G.N. STEWART

Studies on adrenal insufficiency. IV. The influence of intravenous injections of Ringer's solution upon the survival period in adrenalectomized dogs.- Am. J. Physiol. 84 : 649-659, (1928)

FOSNER, J.M., COS, J.J., BIGLIERI, E.G., HANE, S. and FORSHAM, P.H.

Determination of urinary unconjugated cortisol by glass fiber chromatography in the diagnosis of Cushing's Syndrome.- J. Clin. Endocr., 23, 820. (1963)

ROSS, E. J.

Urinary excretion of cortisol in Cushing's Syndrome: effect of corticotropin.- J. Clin. Endocr., 20, 1360.- (1960)

ROWNTREE, L. G., C.H. GREENE, W.W. SWINGLE, and J.J. PFIFFNER

The treatment of patients with Addison's disease with the "cortical hormone" of Swingle and Pfiffner.- Science 72 : 482,483, (1930)

SARRETT, L.H.

Partial synthesis of pregnene-4-triol-17(β), 20(β), 21-dione-3, 11 and pregnene-4-diol-17 (β), 21-trione-3,11,20 monoacetate. J. Biol. Chem. 162: 601-632 (1946)

SASAKI, C., NOWACXINSKI, W., KUCHEL, O., CHAVEZ, C., LEDOUX, F., GAUTHIER, S., GENEST, J.

Plasma progesterone in normal subjects and patients with benign essential hypertension on normal, low and high sodium intake. J. Clin. Endocrinol. Metab., 34, 650, (1972)

SEIDENSTICKER, J. F., FOLK, R.L., WIELAND, F.G. and HAMWI, F.J.

Screening test for Cushing's syndrome with plasma 11-hydroxycorticosteroids.- J. Amer. Med. Ass., 202, 87 (1967)

SELYE, H.

The general adaptation syndrome and diseases of adaptation.- J. Clin. Endocrinol. Metab. 6: 117-230. (1946)

SIEGEL, S.

Estadística no paramétrica.- Ed. Trillas, Mexico, (1972)

SILBER, R. H., BUSCH, R. D. and OSLAPAS, R.

Practical procedure for estimation of corticosterone or hydrocortisone.- Clin. Chem. 4, 278 (1958)

SILVER, R. H., PORTER, C.C.

Determination of 17,21-dihydroxy-20ketosteroids in urine and plasma.- J. Biol. Chem., 210, 923, (1954)

SIMPSON, S. A. and J. F. TAIT

Recent progress in methods of isolation, chemistry and physiology of aldosterone.- Recent Progr. Hormone Res. 11: 183-210, (1955)

SOBEL, C., GOLUB, O.J., HENRY, R.J., JACOBS, S.L. and BASU, G.K.

Study of the Norymberski methods for determination of 17-ketogenic steroids (17-hydroxycorticosteroids) in urine J. Clin. Endocr., 18, 208 (1958)

SOMERVILLE, P. N.

Tables for obtaining nonparametric tolerance limits.- Ann. Math. Statist. 29, 599. (1958)

STAHL, F. and DORNER, G

Eine einfache spezifische routine Methode zur fluorometrischen Bestimmung von unkonjugierten 11-hydroxycorticosteroiden in Körperflüssigkeiten.- Acta Endocr. (Kbh.), 51, 175.(1966)

STEIGER, M von, and T. REICHSTEIN

Desoxy-cortico-steron (21-Oxyprogesteron) aus Δ^5 -3-Oxy-atiocholensaure.- Helv. Chim. Acta 20: 1164-1179, (1937)

SWEAT, M.L. and FARRELL, G.L.

Resolution and quantitative analysis of steroids in adrenal vein blood.- J. Clin. Endocr., 12, 968 (Abst) (1952)

SWEAT, M.L.

Adrenocorticosteroids in peripheral and adrenal venous blood of man.- J. Clin. Endocr., 15, 1043. (1955)

SWINGLE, W.W. and J.J. PFIFFNER

An aqueous extract of the suprarenal cortex which maintains the life of bilaterally adrenalectomized cats. Science 71: 231-322. (1930)

SWINGLE, W.W. and J.J. PFIFFNER

Studies on the adrenal cortex. I. The effect of a lipid fraction upon the life span of adrenalectomized cats.- Am. J. Physiol. 96: 153-163,(1931)

TARQUINI, B. and TOCCAFONDI, R.

Determinazione spettrofluorimetrica dei corticoidi plasmatici liberi. Lo Sperimentale, 115, 195 (1965)

TOWNSEND, J. and JAMES, V.H.T.

A semi-automated fluorimetric procedure for the determination of plasma corticosteroids.- Steroids, 11, 497.(1968)

Van der MOLEN, H.J., AAKVAAG, A

Progesterone. En "Hormones in blood". Eds. C.H. Gray and A.L. Bacharach. p. 221. Academic Press. New York, Londres, (1967)

- VECSEI, P., PENKE, B., KATZY, R., BAEK, L.
Radioimmunological determination of plasma cortisol.- *Experientia*
8, 1104, (1972)
- VENNING, E.H., HOFFMAN, M.M. and BROWNE, J.S.L.
Isolation of androsterone sulfate.- *J. Biol. Chem.*, 146, 369
(1942)
- VIEDMA, J.A.
Métodos estadísticos. Ed. del Castillo, Madrid,(1972)
- WALD and WOLFAWITZ, J.
Tolerance limits for a normal distribution.- *Ann. Math. Statist.*
17, 208. (1946)
- WERK, E.D., THEISS, K.E., CHOI, Y.K. and MARNELL, R.T.
Interference of Heparin containing benzyl alcohol with fluorimetric
determination of plasma corticosteroids.- *J. Clin. Endocr.*, 27,
1350 (1967)
- WEST, D.C., REICH, H., and SAMUELS, L.T.
Urinary metabolites after intravenous injection of human subjects
with testosterone.- *J. Biol. Chem.*, 193, 219 (1951)
- WILCOXON, F.
Individual comparisons by ranking methods.- *Biometrics* 1, 80-83,
(1945).
- WILKS, S.S.
Statistical prediction with special references to the problem
of tolerance limits.- *Ann. Math. Statist.* 13, 400. (1941)
- WILSON, H.
Chromogenic values of various ketosteroids in a micro modifi-
cation of the Zimmerman reaction: comparison with a macro procedure.
Arch. Biochem. Biophys., 52, 217 (1954)

WILSON, H. and FAIRBANKS, R.

A rapid micro-methods for the determination of 17-hydroxy- and 17-ketosteroids.- Arch. biochem. Biophys., 54, 440 (1955)

WOOD, J. B., FRANKLAND, A. W., JAMES, V.H.T. and LANDON, J

A rapid test of adrenocortical function.- Lancet, 1, 243. (1965)

WOOLLEY P.G.

Adrenal tumors. Am. J. Med. Sci. 125: 33-46, (1902)

ZAK, B., EPSTEIN, E. and KRAUSHAAR, L. A.

Semi-automated determination of 17-ketosteroids and 17-ketogenic steroids.- Automation in analytical chemistry. Medical. New York, N. J. 1965, p. 336 (1965)

ZENKER, N. and BERNSTEIN, D.E.

The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. J. Biol. Chem., 231, 695. (1958)

ZIMMERMANN, W.

Eine farbreaktion des sexualhormone und ihre unwendung zur quantitativen colorimetrischen bestimmung. Z. Physiol. Chem. 233, 257. (1935).