

REVISTA CLÍNICA ESPAÑOLA

Director: C. JIMENEZ DIAZ. Secretarios: J. DE PAZ y F. VIVANCO
REDACCION Y ADMINISTRACION: Antonio Maura, 13. MADRID. Teléfono 22 18 29.

TOMO LX

15 DE ENERO DE 1956

NUMERO 1



REVISIONES DE CONJUNTO

DIAGNOSTICO HORMONAL DE LAS FUNCIONES HIPOFISARIAS (*)

F. VIVANCO.

Jefe de la Sección de Nutrición, Hormonas y Vitaminas del Instituto de Investigaciones Médicas, Madrid.

La hipófisis constituye la glándula rectora de las demás glándulas de secreción interna; de aquí que sus funciones se ejerzan ampliamente sobre multitud de órganos y que las consecuencias de su hiper o hipofunción puedan sentirse "a distancia" sobre tejidos los más diversos (óseo, cartilaginoso, vascular, epitelial, etc.) o sobre actividades funcionales las más variadas (M. B., glucemia, calcemia, diuresis, etc.) e inmediatamente por cambios morfológicos en la misma hipófisis (tumores, radiografías de silla turca, etc.). Por todo ello, fácilmente se comprende que, aparte de la anamnesis y el examen clínico de los enfermos, disponemos hoy de una serie de métodos, pruebas o tests, que nos permiten juzgar—unos con más fidelidad que otros—del estado funcional de la hipófisis. La enumeración y discusión de todos ellos haría interminable esta exposición, por lo que en ella me voy a limitar a exponer, discutiendo su valor clínico, los métodos basados en el diagnóstico hormonal, bien por determinación directa de la hormona en cuestión en los líquidos orgánicos (sangre y orina), bien por la administración de una determinada hormona, y el estudio de sus efectos.

Por otra parte, el problema del estudio de las funciones hipofisarias se complica aún más al comprobar que la hipófisis se compone de dos porciones funcionalmente diferentes: la adenohipófisis o lóbulo anterior y la neurohipófisis o lóbulo posterior. Que tenemos que distinguir entre hormonas y efectos hipofisarios. La mayor parte de aquéllas han sido aisladas en estado puro y obtenidas cristalizadas; también la mayor parte de éstos han sido ad-

critos a alguna de las hormonas conocidas, no existiendo hoy evidencia de que existan más hormonas que las que aparecen en la figura 1. Sin embargo, el si alguno de estos efectos puede constituir una hormona independiente, constituye aún un tema de discusión. Por último, algunos de los métodos propuestos para la dosificación de las hormonas hipofisarias no tienen todavía aplicación clínica, por difíciles o poco asequibles a la rutina de un laboratorio clínico, y otras determinaciones hormonales, en cambio, no nos revelan sino indirectamente el estado funcional hipofisario.

En la figura 1 hemos agrupado aquellos métodos basados en determinaciones hormonales que, a nuestro juicio, son más útiles actualmente en el diagnóstico en clínica de las afecciones hipofisarias. Dentro de ellos, los doblemente subrayados son los más asequibles, los más usados y sobre lo que existe una mayor experiencia de su utilidad y de la interpretación y valoración de los datos. Los dividimos en dos grupos, que los denominamos directos e indirectos. Aquéllos son los basados en la dosificación directa en sangre y orina de las hormonas hipofisarias como tales. Los indirectos son los que miden las hormonas producidas por las glándulas efectoras, sobre las que actúan las tropinas hipofisarias. Sucesivamente discutiremos cada uno de ellos.

MÉTODOS DIRECTOS.

1. *Gonadotropinas.*—Tres clases de gonadotropinas pueden ser hoy dosificadas: a) Las gonadotropinas hipofisarias. b) La gonadotropina coriónica; y c) La gonadotropina del suero de yegua embarazada. Las dos primeras aparecen en la orina, mientras que la tercera no atraviesa el riñón. Por eso, y por su importancia clínica, son las dos primeras las que nos interesan en este estudio.

Las gonadotropinas hipofisarias son de tres clases: la hormona foliculo-estimulante o FSH, que estimula el crecimiento folicular del ovario y el epitelio germinal de los testículos; la hormona luteinizante o intersticial (LH), que estimula el desarrollo del cuerpo lúteo y las células intersticiales de Ley-

(*) Conferencia pronunciada en el Curso sobre "Hipófisis y diencefalo", celebrado en el Servicio de Medicina General y Nutrición del profesor C. BLANCO SOLER, del Hospital de la Cruz Roja, Madrid, febrero 1955.

dig masculinas, y la hormona lúteotropa o de mantenimiento del cuerpo lúteo y excitadora de la progesterona, que no es sino la prolactina. La gonadotropina coriónica en el macho semeja a la LH, mientras que en la hembra actúa como una mezcla de FSH y LH, con predominio de esta última. La hormona de suero de yegua embarazada, en cambio, se asemeja a una mezcla de ambas, con predominio de FSH.

No existe, hoy por hoy, ningún método químico de confianza para la dosificación de estas hormonas, por lo que nos es necesario recurrir a los mé-

voy a insistir por ser de todos conocidos su gran importancia, exactitud y seguridad en el diagnóstico precoz del embarazo. Detalles de todos estos métodos pueden consultarse en ¹ y ².

Cada uno de los efectos anteriormente mencionados se influye de manera diferente, según el predominio de FSH o de LH en la mezcla a ensayar. Así, mientras la FSH produce sobre todo una maduración de los folículos, el aumento de peso de ovarios es discreto y el de útero más visible. En cambio, la LH produce específicamente un mayor peso de ovarios, folículos hemorrágicos y un aumento de las

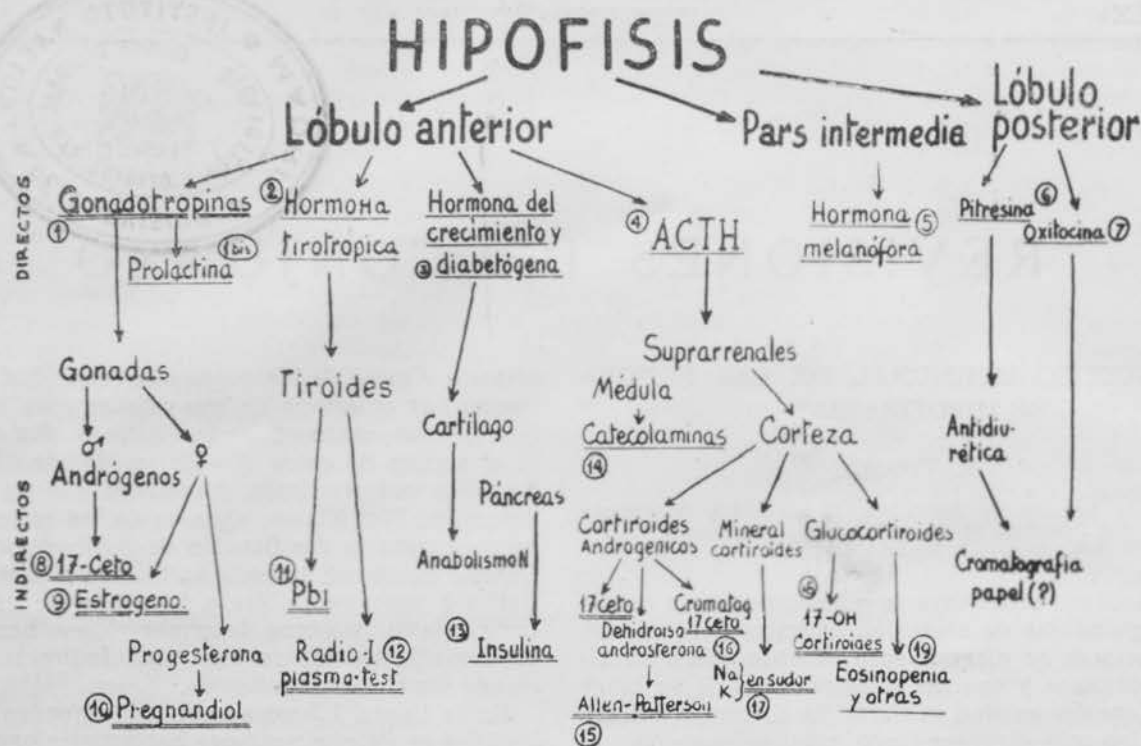


Fig. 1.

todos biológicos. Todos ellos están basados en la acción de las gonadotropinas sobre las glándulas efectoras, en este caso ovarios o testículos, o sobre otros órganos genitales íntimamente dependientes de la secreción hormonal secundaria de las gonadas, como útero, epitelio vaginal o vesículas seminales. El ideal sería trabajar con animales hipofisectomizados, como veremos que es indispensable con otras hormonas de la hipófisis; pero en el caso de las gonadotropinas la experiencia ha demostrado que el empleo de animales impúberes—sobre todo rata y ratón—es factible, ya que la propia hipófisis no segrega a esa edad prácticamente gonadotropinas.

Hoy existen infinidad de métodos biológicos de dosificación de las gonadotropinas, pero todos ellos se basan en el estudio de alguno de estos efectos en la rata o en el ratón impúberes: 1) Aumento de peso del ovario. 2) Aumento de peso del útero. 3) Cambios del epitelio vaginal. 4) Formación de folículos hemorrágicos y aparición de cuerpos lúteos. 5) Cambios histológicos del ovario, testículo y útero; ó 6) Aumento de peso de las vesículas seminales. Aparte de ellos tenemos los métodos sensibles a grandes dosis de gonadotropina coriónica, o reacciones de embarazo, como el Ascheim-Zondek, Friedmann o los más modernos del *Xenopus levi* o la rana o sapo machos (*Galli-Mainini*), sobre los que no

vesículas seminales. Ambas provocan un aumento del peso de los testículos.

Cuando nosotros en la clínica queremos juzgar la función gonadotrópica de la hipófisis, nos interesará emplear un método que dosifique ambos efectos, pero más intensamente el FSH, ya que es sobre todo esta hormona la que aumenta en casos de hiperfunción hipofisaria. Muchas veces es difícil decir ante unas gonadotropinas aumentadas en orina, por ejemplo, en un tumor testicular, en qué proporción es debida a una hiperfunción de FSH o de LH (por descenso de la producción androgénica o inhibina frenadoras) o a la producción de gonadotropina coriónica por las células propias del tumor (corioepitelioma). En todo caso, el hecho importante de valor diagnóstico es el aumento total de la eliminación de gonadotropinas.

Los métodos propuestos por KLINEFELTER y colaboradores ³, MADDOCK y HELLER ⁴ o modificaciones de ellos, son prácticos en la determinación de las gonadotropinas urinarias. Pueden emplearse ratones o ratas impúberes de 21-25 días de edad, midiéndose al final el peso del útero, el de los ovarios y, si se quiere, completar el estudio con el examen del frotis vaginal. El examen histológico del ovario complica extraordinariamente la prueba y no lo juzgamos necesario. Dos hechos más conviene resaltar para juzgar del valor clínico de la dosificación de

las gonadotropinas hipofisarias en la orina. El primero, que no puede emplearse la orina como tal, sino que es necesario concentrarla, bien por precipitación con alcohol, ácido tánico, etc., por adsorción con ácido benzoico, kaolín, etc., o por ultrafiltración (GORBMAN). El segundo es que la sensibilidad del método sólo permite, por lo menos en nuestras manos y en las de muchos autores, medir con cierta seguridad los aumentos, pero no las disminuciones de lo normal. Si se trata de una mujer, debe tenerse en cuenta el día del ciclo en que se hace la determinación, ya que las gonadotropinas fluctúan en el curso del mismo. Hecha esta salvedad, pasamos a describir la técnica usada por nosotros.

Es una modificación del método de JUNGCK, MADDOCK y HELLER⁵. Se precipita la mitad de la diuresis de 24 horas con cinco veces su volumen de alcohol. El precipitado se separa por decantación, centrifugación y lavado ulterior con alcohol de 96°, alcohol absoluto y éter sulfúrico anhidro. Se deja secar en desecador. El polvo blanco resultante es activo durante meses. Para la prueba se disuelve en suero fisiológico a pH 5, obteniendo tantas fracciones de 3 c. c. como animales inyectemos, y preparando diluciones que lleven en 3 c. c. 1/4, 1/20 y 1/40 de la diuresis. Empleamos ratas hembras impúberes de 23-27 días y 30-40 gr. de peso. Inyectamos 0,5 c. c. dos veces al día durante tres días, sacrificando los animales a las 96 horas del comienzo de la prueba. Se pesan el útero y los ovarios con balanza de torsión. Algunas veces se ha hecho también frotis vaginal cuyo dato ha sido muy útil como complemento de la interpretación de la prueba. Tomamos como U. R. la dosis mínima que produce 100 por 100 de aumento del peso del útero. En nuestra colonia de ratas viene a equivaler a 1 U. I. de gonadotropina coriónica. Recientemente hemos uti-

lizado ratonas impúberes de 21 días y unos 7 gm. de peso, por ver si aumentábamos la sensibilidad del método, ya que nuestros normales no llegan a eliminar diariamente las 4 U. R., pero hasta ahora con resultados negativos, a pesar de que KLINEFELTER y colaboradores³ ven eliminaciones en normales que oscilan de 6 a 20 U. R. en los hombres y de 6 a 50 U. R. en las mujeres.

Esta incapacidad para medir hipoeliminaciones, así como el gran número de animales que se necesitan, el tiempo empleado y los errores inherentes a todas las pruebas biológicas, son las que han llevado a la búsqueda de un método químico apropiado para medir las gonadotropinas en la orina. Últimamente, CROOKE, BUTT y cols.⁶ y ⁷ han desarrollado un método químico y cromatográfico. Las gonadotropinas son, junto a la TSH, las únicas hormonas hipofisarias que son glucoproteínas, y si bien no poseen ninguna reacción específica, se las puede purificar por adsorción con fosfato tricálcico y practicar la dosificación inespecífica de sus grupos amínicos libres por la reacción de la ninhidrina de MOORE y STEIN⁸ o de la glucosa por la del orcinol de RIMINGTON⁹. Los resultados se expresan en equivalentes en µg. de glucocola o de glucosa por hora o por 24 horas. Nosotros actualmente ensayamos esta reacción con GORIGOTIA, con la sospecha de ser más factible en la práctica la reacción del orcinol, y con la esperanza de poder con ella determinar eliminaciones disminuidas, aparte de expresar los resultados en datos más objetivos que los de los métodos biológicos. Sin embargo, la experiencia conseguida hasta la fecha es más bien desconsoladora.

En estos últimos años hemos realizado 240 determinaciones cuantitativas de gonadotropinas hipofisarias en orina con el método biológico ya mencionado. En los cuadros I y II aparecen los resul-

CUADRO I

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS POR METODO BIOLOGICO EN 90 MUJERES, EXPRESADO EN U. R.

DIAGNOSTICOS	Total casos	Negativas — 4	Positivas		
			+ 4	+ 20	+ 40
Amenorreas con insuficiencia ovárica	16	7	2	5	2
Tensión premenstrual o trastornos del ciclo.....	5			4	1
Corioepitelioma	2				2
					(200.000 U. R.)
Menopausia	3		1	2	
Mastopatía quística	1			1	
Castraciones	3		1	2	
Abortos de repetición	1		1		
Tumor ovárico	1		1		
Adenoma hipofisario	5	3		2	
Acromegalia	4	4			
Froehlich	2	1	1		
Pubertad precoz	2		1	1	
Hiperpituitarismo	2		1	1	
Insuficiencia hipofisaria y Simmonds	5	5			
Sheehan	2		1	1	
Infantilismos hipofisarios	2	2			
Infantilismos por estenosis intestinal	1		1		
Lawrence-Moon-Biedl	1			1	
Basedow	2	1	1		
Mixedema	1	1			
Cushing e hipercorticalismos	9	4	3	2	
Hipofunción suprarrenal	1	1			
Galactorrea	1			1	
Diabetes	1		1		
Obesidad	2	2			
Seudohermafrodita	1			1	
Varios no endocrinos	14	14			

CUADRO II

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS POR METODO BIOLOGICO EN 40 VARONES, EXPRESADOS EN U. R.

DIAGNOSTICOS	Total casos	Negativas — 4	Positivas		
			+ 4	+ 20	+ 40
Tumores testiculares	7	2		2	3 (200)
Infantilismos gonadales	9		3	5	1
Infantilismos hipofisarios	8	8			
Acromegalias	1	1			
Froehlich	1	1			
Pubertad precoz	1	1			
Pinealoma	1	1			
Lawrence-Moon-Biedl	1	1			
Mixedema hipofisario	1	1			
Bocio	1		1		
Cushing	1		1		
Ginecomastia	3	3			
Obesidad	1	1			
Varios no endocrinos	4	4			

tados en 90 mujeres y 40 varones cuyos diagnósticos han sido plenamente confirmados, pertenecientes a los Servicios de los Hospitales de San Carlos y Provincial del profesor JIMÉNEZ DÍAZ.

En ellos puede verse cómo su gran valor en clínica radica en el diagnóstico diferencial entre las insuficiencias gonadales primarias o secundarias a un déficit hipofisario. En las amenorreas acompañadas de insuficiencia ovárica, nos diferencian las agenesias ováricas (síndrome de Turner), o los trastornos ovulatorios de origen ovárico, de los primitivamente hipofisarios. Es también de señalar su aumento en los síndromes de tensión premenstrual, en las menopausias o castraciones quirúrgicas, así como en un caso de abortos de repetición y en otro de tumor ovárico. Todos estos datos coinciden con los existentes en la literatura, así como la tremenda eliminación en dos casos de corioepitelioma (más de 200.000 U. R.).

Entre los síndromes puramente hipofisarios, conviene señalar que eliminan por debajo de 4 U. R. los síndromes de Froelich, las acromegalias, algunos adenomas hipofisarios y las insuficiencias hipofisarias, panhipopituitarismos y Simmonds. Por el contrario, los dos casos de necrosis hipofisaria postpartum o síndrome de Sheehan cursan con gonadotropinas elevadas, lo que puede tener un gran valor diagnóstico frente a cuadros de Simmonds de otra naturaleza. Por otra parte, el hecho de que estén disminuidas en la acromegalia, en algunos casos de Cushing y en uno de Bassetow, nos demuestra que las hormonas del lóbulo anterior funcionan en cierto modo independientes, pudiendo coexistir la hiperproducción de una de ellas con la normalidad e incluso el descenso de otra. Esto es más probable que ocurra entre hormona de crecimiento, LH y lactogénica, por un lado, y FSH, tirotrópica y ACTH, por otro, por provenir las primeras de las células eosinófilas y las segundas de las basófilas.

En el hombre la determinación de gonadotropinas tiene gran valor diagnóstico en los tumores testiculares para juzgar si son o no funcionantes (seminomas, corioepiteliomas)—que cursan con gonadotropinas elevadas—y su grado de malignidad. Sin embargo, en nuestra estadística los dos casos con gonadotropinas negativas eran carcinomas muy invasores y destructivos y de mal pronóstico.

Igual que en la mujer, sirven también para diferenciar los infantilismos de origen primariamente gonadal de los hipofisarios. En este sentido, su determinación asociada al estudio de la espermatogénesis y a la biopsia testicular ha permitido diferenciar los tres síndromes clínicos de hipofunción testicular hoy conocidos: el de ALBRIGHT y cols.¹⁰, el de KLINEFELTER¹¹ y el de CASTILLO y cols.¹². En los dos primeros, hay azoospermia con aumento de gonadotropinas en la orina; en el segundo, se añade la aparición de ginecomastia. En el de CASTILLO, en cambio, falta ésta y las gonadotropinas están normales o descendidas. Como en este síndrome se conservan las células de Leydig y las de Sertoli, se cree que tanto la ginecomastia como el aumento de gonadotropinas se debe a la falta en los síndromes de Albright y Klinefelter de una inhibina estrogénica segregada por las células de Sertoli destruidas en estos síndromes. Esta inhibina frenaría normalmente la hipófisis anterior y la formación de estrógenos feminizantes (ver¹³).

En el resto de las afecciones endocrinas en varones, las gonadotropinas no están aumentadas. Sólo las observamos ligeramente elevadas en un caso de bocio normofuncional y en un síndrome de Cushing. Su significación no es tan valiosa en estos casos.

1 bis. *Prolactina*.—Se ha obtenido cristalizada. Es una globulina soluble en agua, termolábil, que tiene la propiedad de estimular la secreción láctea de los mamíferos (sobre todo conejo y cobaya) previamente tratados con gonadotropinas o estrógenos, así como la del buche de las palomas. Este último método es considerado hoy como el más sensible y de más fácil realización. El producto a ensayar se inyecta por vía intramuscular o directamente subcutáneo sobre la glándula del buche de la paloma durante cuatro días. Al quinto se sacrifica el animal y se pesan las glándulas. El aumento de peso sirve de índice de actividad. Quitando su determinación en la orina de mujeres lactantes¹⁴, que puede ser útil para juzgar sobre la marcha de la lactancia, no tiene esta determinación grandes aplicaciones clínicas. Detalles técnicos pueden obtenerse en el libro de EMMENS¹.

2. *Hormona tirotrópica* (T. S. H.).—No existe ningún método de dosificación de hormona tirotrópica que sea aplicable a la rutina de un laboratorio

clínico. Los métodos existentes están todos basados en los efectos que esta hormona ejerce sobre su glándula efectora, el tiroides o sobre alguno de los efectos que la hormona tiroidea produce a su vez. Los que podemos llamar clásicos miden: 1) El peso del tiroides. 2) El descenso de I del mismo. 3) La altura del epitelio de los acinis glandulares. 4) El número de gotas de coloide intracelular; y 5) La aparición de la metamorfosis en los renacuajos.

Como hoy sabemos que la tirotrópica actúa sobre todo facilitando la captación del I halógeno por el tiroides, por un lado, y por otro, acelerando la hidrólisis enzimática de la tiroglobulina con liberación y paso a la sangre de tiroxina y quizá también de triiodotironina, recientemente se han propuesto dos nuevos métodos de medida de la hormona tirotrópica: la captación de I^{131} por el tiroides y la dosificación del iodo proteico de la sangre antes y después de la inyección del extracto de tirotrópica. Un aumento en cualquiera de las pruebas indica una actividad tirotrópica.

Para poder juzgar del efecto de la inyección de esta hormona, tropezamos con el inconveniente de no haber sido obtenida aún en estado puro. Parece tratarse de una globulina, con hexosamina en su molécula, termolábil e hidrosoluble. Su secreción está regulada por la cuantía de la hormona tiroidea en sangre, por lo que en principio debe estar disminuida en el hipertiroidismo y aumentada en el hipotiroidismo, siguiendo la regla general de todas las hormonas trópicas hipofisarias, que son frenadas por las hormonas segregadas por las glándulas efectoras (estrógenos y FSH, cortisona y ACTH, etcétera). En alguna ocasión que ha podido dosificarse esto ha sido confirmado (ver ², ¹⁵ y ¹⁶).

Es interesante conocer la función tirotrópica de la hipófisis en la clínica ante casos en que se sospeche o un mixedema pituitario o por el contrario un hipertiroidismo por hiperfunción tirotrópica. Lo primero ha podido ser demostrado por la respuesta positiva del tiroides a la inyección de TSH. Más difícil es probar que en un hipertiroidismo existe una hiperfunción tirotrópica. Generalmente lo que se encuentra es una actividad tirotrópica normal o disminuida ¹⁵.

En cambio, cada vez es más seguro la existencia de cuadros de exoftalmos de origen hipofisario que sólo obedecen a la administración de hormona tiroidea o tiroides desecado. La tiroidectomía o los antitiroideos los empeora. Se ha hablado incluso de un factor exoftálmico hipofisario, distinto de la hormona tirotrópica, el cual no ha podido ser definitivamente demostrado. En estos casos, la dosificación de la hormona tirotrópica en el futuro tendrá un gran valor diagnóstico diferencial entre los exoftalmos de la tirotoxicosis que ceden al tratamiento antitiroideo y los malignos, que sólo ceden al frenar la hipófisis.

En resumen, aunque no estamos aún en condiciones de dosificar la hormona tirotrópica en los líquidos orgánicos de una manera habitual, su medición por cualquiera de los métodos señalados o la respuesta tiroidea a su administración son de gran valor diagnóstico y lo serán aún más en el futuro.

3. *Hormona del crecimiento y diabética.*—La dosificación de esta hormona no pasa de tener hoy por hoy un interés académico. Puede hacerse o midiendo el aumento de peso corporal de ratas estandarizadas ("plateau") hembras o de ratas hipofisectomizadas o con el método más sensible y seguro

de medir la anchura del cartilago epifisario en ratas hipofisectomizadas ¹⁷ y ¹⁸. Como la hormona del crecimiento es la única hormona del lóbulo anterior que no actúa sobre otra glándula de secreción interna, sino sobre el cartilago de crecimiento o sobre funciones metabólicas, no es posible juzgar de su efecto estudiando las hormonas de la glándula efectora. En cambio, se ha propuesto recientemente, basándose en su acción sobre el metabolismo del N, medir la incorporación al músculo esquelético de la metionina etiquetada con S^{35} (FRIEDBERG y GREENBERG ¹⁹). Quizá este método sea promotor en el futuro. En la clínica no se juzga de los trastornos del crecimiento por dosificación de esta hormona, sino por otras pruebas no hormonales.

4. *ACTH o adrenocorticotropina.*—Los métodos utilizados para la dosificación directa de esta hormona están también basados en sus efectos sobre la corteza suprarrenal. Unos, miden el cambio de peso de las suprarrenales en ratas intactas (método inseguro por la presencia de la propia hipófisis del animal); otros, el mantenimiento del peso de las glándulas en ratas hipofisectomizadas. Pero el más sensible y exacto de los existentes hasta la fecha es la dosificación del descenso del contenido en ácido ascórbico de las suprarrenales de ratas hipofisectomizadas, provocado por la acción del ACTH. Con este método, estandarizado por SAYERS ²⁰, se pueden medir cantidades inferiores a 1 μ g. de la hormona, comparando el contenido de una suprarrenal extirpada inmediatamente después de la inyección intravenosa de la hormona, con el de la otra extirpada una hora después. Desgraciadamente, no existe aún un método satisfactorio para concentrar y determinar esta hormona en sangre y en orina, aunque han sido comunicados casos de su falta total en la orina en casos clínicos de Addison, que serían así primariamente hipofisarios. En el Cushing, según JORES, está aumentada, y según LOCKE y KEPLER, su eliminación es normal ¹⁵.

Por el contrario, la obtención pura de esta hormona ha permitido utilizarla en una serie de pruebas diagnósticas, basadas en los cambios producidos en las hormonas corticales después de su inyección. De estos cambios nos ocuparemos más adelante al tratar de las hormonas de la corteza suprarrenal. Baste ahora decir que la inyección de ACTH produce en el hombre normal un aumento de las tres clases de esteroides que segrega la corteza: androgénicos, mineralcorticoide y glucocorticoide. La falta de respuesta es siempre signo seguro de insuficiencia cortical. La hiperfunción adrenocorticotrópica no es en cambio tan fácil de medir, ya que es difícil apreciar una respuesta exagerada.

Por último, hay que hacer constar que las pruebas indirectas propuestas por THORN ²¹ de medición de eosinopenia, linfopenia o cociente creatinina/ácido úrico, por inyección de adrenalina, adolecen de los siguientes defectos: 1) La adrenalina no hace sino excitar la producción de ACTH por la hipófisis. Por tanto, es negativa tanto en la insuficiencia cortical primaria (Addison) como en la secundaria o hipofisaria. 2) La eosinopenia es un efecto directo de la hidrocortisona (compuesto F) sobre los glóbulos. También falta tanto en el Addison como en el panhipopituitarismo. Su asociación a la prueba con ACTH puede tener un gran valor diagnóstico, como luego veremos.

Recientemente se ha sugerido que el ACTH pueda tener un efecto melanóforo y que los tests pro-

puestos para esta hormona podrían servir en el futuro para medir el ACTH²². En nuestro país, CABELLERO²³ sostiene esta tesis y piensa que la prueba del iris de la rana hipofisectomizada (repigmentación al inyectar extractos hipofisarios) pueda servir en el futuro de medio diagnóstico. No olvidemos, sin embargo, que el ACTH se ha obtenido en estado puro; que es un polipéptido de bajo peso molecular, termoestable e hidrosoluble, y que por esta razón no produce reacciones alérgicas ni da lugar a la producción de antihormonas, como ocurre con las otras hormonas proteicas hipofisarias. Este aspecto está íntimamente relacionado con el de la hormona, de la que nos ocupamos a continuación.

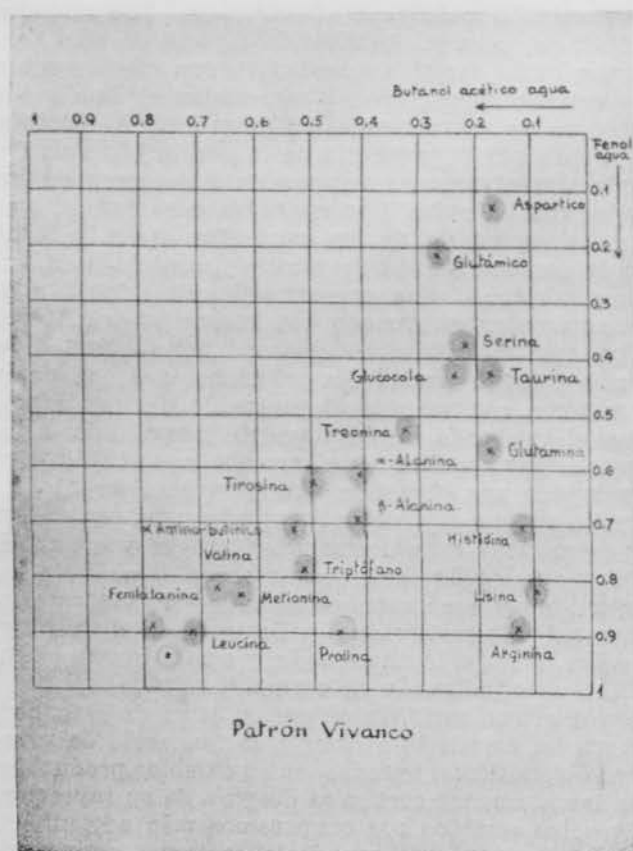


Fig. 2.

5. *Intermedina u hormona melanófora*.—De escasa importancia actual en clínica humana. Ha sido medida por el grado de expansión de los melanóforos de la piel de batracios expuestos a la luz sobre un fondo claro²⁴. Es un polipéptido difícil de separar químicamente del ACTH. La hormona melanófora ha sido encontrada aumentada en la orina de enfermos con sarcoma melánico, cáncer, retinitis pigmentosa y tumores hipofisarios, así como en las embarazadas²⁵. Poco sabemos sobre la acción en clínica de la intermedina. Quizá la pigmentación que producen los tratamientos prolongados con ACTH esté relacionada con este efecto.

6 y 7. *Hormona presora, antidiurética y oxitocina*.—Los extractos de lóbulo posterior de hipófisis se han caracterizado siempre por presentar tres efectos claramente marcados: 1) Un efecto antidiurético por aumento de reabsorción de agua en los tubos renales. 2) Un efecto presor por vasoconstricción de arteriolas y capilares; y 3) Un efecto excitador del músculo liso y del músculo uterino

(efecto oxitócico). En un principio parecía que cada efecto correspondería a una hormona diferente. Hoy sabemos que no hay más que dos hormonas. La *vasopresina*, que es al mismo tiempo la hormona anti-diurética, y la *oxitocina*, que en ciertas condiciones puede tener más bien efectos diuréticos.

El efecto *presor* y el *oxitócico* pueden medirse por métodos farmacológicos. En el primer caso, la técnica más empleada es la de HAMILTON y ROWE²⁶ y²⁷ de medir la presión arterial de perro o gato anestesiado. En el segundo, la contracción de una tira uterina de cobaya virgen normal²⁸. Sin embargo, conviene decir que hoy por hoy no sabemos la importancia fisiológica de la oxitocina en clínica humana ni siquiera en el momento del parto. Algo parecido ocurre con la vasopresina. El efecto *presor* se observa en los animales, pero el sistema vascular humano no responde a la pitresina (RAAB²⁹). A grandes dosis provoca hipotensión. A dosis más fisiológicas, vasoconstricción general, pero sobre todo de las coronarias, con ansiedad miocárdica. Este efecto es parcialmente antagonizado por la oxitocina, que provoca hipotensión moderada. Es decir, que lo más seguro es que, aunque la hipófisis humana segregue vasopresina, esta hormona, en sus dosis fisiológicas, es rápidamente destruida o neutralizada, no jugando ningún papel en la regulación fisiológica de la presión arterial humana.

El efecto más importante en clínica es el antidiurético. Esta hormona se tenía por segregada en los pituiticos del lóbulo posterior bajo la excitación de los impulsos nerviosos procedentes de los núcleos supraóptico y paraventricular y del tuber cinereum del hipotálamo. Estos, a su vez, reciben impulsos de otros centros o se excitan por los cambios en presión osmótica del líquido que los baña. Quizá la hormona es producida en realidad en esos centros y sólo almacenada en los pituiticos. En todo caso, su salida a la sangre regula la diuresis, produciendo un aumento de reabsorción de agua en los tubos renales. Este efecto se acompaña, aunque no siempre, de un aumento de eliminación de los c oruros.

Se han propuesto un sin fin de métodos para medir la HAD en la crina. Todos ellos son modificaciones al método original de BURN³⁰. PALACIOS, en mi Sección del Instituto de Investigaciones Médicas, ha utilizado el método de GROLLMAN y WOODS³¹ modificado. Se emplean ratas adultas de 150 a 200 gramos de peso, machos, en ayuno previo de 20 horas. Se administra por sondaje gástrico un 5 por 100 de su peso de agua, inyectando inmediatamente el extracto problema por vía intraperitoneal. Se mide después o el tanto por ciento de la sobrecarga eliminado en un tiempo dado (90') o el tiempo tardado en eliminar el 25 y el 50 por 100 de la diuresis. Este último procedimiento nos ha dado mejores resultados. En este método la orina es previamente purificada por adsorción con carbón, elución con ácido acético glacial y precipitación ulterior con una mezcla de alcohol absoluto y éter de petróleo. El precipitado seco se disuelve en agua, en proporción tal que a la diuresis total corresponden 100 c. c. De esta solución se inyecta 1 c. c. por 100 gr. de peso a los animales.

Los datos obtenidos por PALACIOS en sujetos normales y en enfermos hepáticos pueden verse en el cuadro III. Existe un evidente aumento de HAD en estos últimos, pero conviene insistir en que ya los normales presentan un efecto antidiurético.

Mucho se ha discutido la importancia del aumen-

to de HAD en la orina de enfermos con edemas, ascitis, cardiopatías en asistolia, etc., así como si esta sustancia urinaria corresponde realmente o no a la hormona antidiurética.

RALLI y LESLIE³² creen que debe llamarse a sustancia antidiurética por ser diferente de la hormona hipofisaria; BIRNIE y cols.³³, por el contrario, creen que son idénticas, ya que no existe acción antidiurética en el suero de ratas hipofisectomizadas. Estos mismos autores sugieren³⁴ que los glucocorticoides tendrían una acción antagónica de la HAD. Probablemente, la sustancia antidiurética de la orina no es sino la hormona del lóbulo posterior alterada, quizá por oxidación (GROLLMAN³⁵), que conserva sus propiedades de retención de agua habiendo perdido su actividad clorurética.

CUADRO III

ELIMINACION POR LA ORINA DE SUSTANCIA
ANTIIDIURETICA

CASOS	Eliminación (en minutos) del 50 % de la sobrecarga hídrica	Retraso (en minutos) respecto de la cifra basal
<i>Normales:</i>		
C. A.	60 80	20
A. M.	75 110	35
A. C.	75 100	25
C. G. C.	60 96	36
M. L.	80 120	40
F. C.	75 95	20
	Media.....	29
<i>Hepatopatías con edemas:</i>		
M. A. Cirrosis Laennec.	67 170	103
F. O. " "	62 100	38
C. V. " "	85 200	115
V. R. " "	75 240	165
A. A. Cirrosis hepatolít.	83 147	64
C. G. Hepat. evol. crón.	61 105	44
C. G. " " "	77 145	68
	Media.....	85

En cada caso, la primera cifra representa la eliminación, después de la sobrecarga de agua, en condiciones basales; la segunda, la eliminación en los mismos animales después de la inyección del extracto correspondiente.

Recientemente, DU VIGNEAUD y cols.³⁶ han obtenido sintética la oxitocina y dado un gran avance en la purificación de la vasopresina o antidiuretina. La oxitocina es un polipéptido de peso molecular alrededor de 1.000 que contiene azufre en su molécula y 8 aminoácidos. De ellos, 6 son comunes a las dos hormonas: ácido aspártico, ácido glutámico, glucocola, tirosina, cistina y prolina. La oxitocina posee además leucina e isoleucina, y la vasopresina, en cambio, fenilalanina y lisina o arginina. Si nosotros recordamos la posición respectiva de la leucina y de la lisina o arginina en los cromatogramas en papel bidimensionales de aminoácidos, como puede verse en la figura 2, vemos que quizá este método pueda servir en el futuro para la dosificación rápida y segura de estas hormonas.

MÉTODOS INDIRECTOS.

Antes de describir y discutir cada uno de estos métodos, queremos hacer unas consideraciones generales acerca de su valor diagnóstico de las funciones hipofisarias.

Siempre que nosotros dosificamos una hormona de las segregadas por las glándulas sujetas a la acción de las tropinas hipofisarias (gonadas, tiroides, suprarrenales) debemos tener en cuenta los siguientes hechos: 1) Muchas veces lo que dosificamos no es la hormona tal como es fabricada por la glándula, sino productos de su metabolismo o de su transformación durante los métodos empleados. 2) Como regla general, un aumento de producción de estas hormonas frena la tropina hipofisaria correspondiente, por lo que cifras elevadas son un índice indirecto de hipofunción secundaria de la hormona hipofisaria en cuestión. En cambio, otras veces la hiperfunción es primitivamente hipofisaria, acompañándose de aumento de producción de hormonas en las glándulas efectoras. Por eso, como antes decíamos, es difícil juzgar por estos métodos indirectos del estado funcional hipofisario en los casos de hiperfunción de la glándula efectora. 3) En los casos de hipofunción de esa misma glándula con cifras hormonales bajas en sangre o en orina, la respuesta a la inyección de la hormona trópica pura, siempre que ello sea posible, tiene un valor diagnóstico decisivo de diagnóstico diferencial entre la hipofunción primaria o la secundaria hipofisaria. Si no hay respuesta, la afección es primaria de la glándula; si la hay, sería secundaria a la hipofunción de la hipófisis. 4) Muchas de estas hormonas están sujetas a un ritmo cíclico de eliminación (diurno-nocturno, ciclo menstrual) y varían con el sexo y la edad, lo cual debe ser tenido en cuenta.

8. *Andrógenos, 17-cetoesteroides.*—Los viejos y clásicos métodos biológicos de dosificación de las hormonas androgénicas, bien por el aumento de peso de las vesículas seminales de ratas machos castradas³⁷ o por el más sensible de la cresta del capón³⁸ y ³⁹ han caído ya en desuso, cediendo el paso a los métodos más sencillos y por lo menos de tanta exactitud, de dosificación química de los esteroides de acción androgénica. Me refiero a la determinación de 17-cetoesteroides.

Hoy existe una amplia bibliografía sobre la dosificación de 17-cetoesteroides en la orina y su significación diagnóstica que no voy aquí a revisar. Prefiero hacer unos comentarios basados en nuestra experiencia personal de más de 2.400 determinaciones. Estos comentarios se refieren, en primer lu-

gar: a) A la metódica, y en segundo término, b) A la interpretación de los resultados.

a) *Metódica.* — Existen innumerables técnicas propuestas, todas ellas basadas en la reacción de Zimmermann, de aparición de color rojo con el m-dinitrobenzeno en reacción alcalina, con los esteroides que tienen un grupo CH_2CO (metilen-cetónico) en el C_{17} . Las variaciones descritas se refieren a: 1) El procedimiento de hidrólisis. 2) El solvente de extracción. 3) El empleo de KOH acuosa o alcohólica. 4) El tiempo de la reacción; y 5) El empleo o no de corrección de filtros en las lecturas. Casi todos son modificaciones del método de CALLOW y CALLOW⁴⁰ y⁴¹ o del de HOLTORF y KOCH⁴². Recientemente, el Medical Research Council ha propuesto un método standard que ha sido aceptado en todos los laboratorios y clínicas de Inglaterra⁴³.

Nosotros venimos utilizando desde hace seis años el método de DREKTER y cols.⁴⁴. Tiene la ventaja de su sencillez y rapidez y, en definitiva, es tan malo o tan bueno como cualquiera de los utilizados. Con él la hidrólisis es clorhídrica, rápida y completa. La extracción se hace con éter sulfúrico libre de peróxidos; utiliza la KOH acuosa y el tiempo de reacción es de 90' a 27°. Nuestra opinión personal en la determinación de 17-cetoesteroides con fines clínicos es que lo esencial es manejar un método con exactitud, siempre el mismo, sea el que fuere, con tal que ofrezca mínimas garantías. Condición indispensable para ello son: que el alcohol absoluto sea muy puro, libre de aldehídos; que el meta-dinitrobenzeno esté muy bien purificado; que la KOH sea reciente y que el éter sulfúrico esté libre de peróxidos. Con estas premisas, el color inespecífico de los cromógenos es mínimo. No creemos eficaz la corrección por lectura adicional con filtro 420 ni las fórmulas propuestas, ya que no puede aplicarse una fórmula fija a un error que es variable.

b) *Interpretación de los resultados.* — En primer lugar, queremos hacer resaltar, con CALLOW⁴⁵, que existe bastante paralelismo entre la dosificación de andrógenos y la de 17-cetoesteroides. Verdad es que no todos los andrógenos dan la reacción (ejemplo, testosterona) y que en cambio la dan sustancias no androgénicas (ejemplo, estrona, que se elimina con los lavados alcalinos). Pero a pesar de esto el paralelismo existe, ya que, por ejemplo, la testosterona producida "in vivo" se elimina prácticamente como 17-cetoesteroides (androsterona y eticolanona).

En cambio, hay que tener en cuenta otros factores. Los hombres segregan un 30 por 100 más que las mujeres, probablemente por la secreción de las células de Leydig. A pesar de eso la dosificación de 17-cetoesteroides no sirve para diagnosticar diferencias de sexo. La eliminación es menor durante el sueño que durante el día, por lo que es necesario expresar los resultados en la orina de 24 horas. En los varones, aproximadamente 2/3 provienen de las suprarrenales, mientras que 1/3 proceden de los andrógenos gonadales. De aquí que la dosificación tenga más valor diagnóstico en los procesos suprarrenales que en los gonadales.

Por otra parte, las oscilaciones de valores normales son tan amplias, tanto en los hombres como en las mujeres (7-16 mg.), que una simple determinación de 17-cetoesteroides tiene tan sólo un valor limitado de simple orientación. La dosificación durante varios días consecutivos es más útil, así como las variaciones que sufren los 17-cetos bajo la ac-

ción de ciertas hormonas (cortisona, ACTH, etcétera), como luego veremos. La dosificación de 17-cetoesteroides neutros totales engloba, como hemos dicho, gran número de esteroides. Con el fin de obtener datos más concretos sobre la eliminación de determinados compuestos, se han propuesto diversos métodos de fraccionamiento. La separación de los esteroides no alcohólicos y ciertos cromógenos, por el reactivo de GIRARD⁴⁶; la separación de los α y β cetoesteroides por precipitación con digitonina⁴⁷; la reacción con el tricloruro de antimonio de PINCUS⁴⁸ y⁴⁹, o las reacciones de aquellos esteroides de mayor significación diagnóstica como la dehidroisoandrosterona, de las que luego hablaremos. Probablemente el grado mayor de separación e información sobre la eliminación aislada de 17-cetoesteroides se obtiene por los métodos de cromatografía en columna del tipo de las de DINGEMANSE y cols. y POND y los suyos. Posteriormente nos referimos a ellos. En cuanto al valor clínico diagnóstico de la determinación de 17-cetoesteroides totales en la orina, en la figura 3 aparecen las cifras medias de los resultados de su determinación en 247 casos de enfermos endocrinos y, entre ellos, de 50 casos de procesos de afectación de la hipófisis anterior. En muchos de los casos, la determinación ha sido repetida una o más veces. Salvando las diferencias de edad y de sexo para claridad de la exposición, podemos concluir que todos los síndromas de insuficiencia hipofisaria cursan con 17-cetos bajos o en el límite bajo de la normalidad. Esto, naturalmente, no tiene valor absoluto de diagnóstico diferencial, pero merece tenerse en cuenta como dato confirmatorio de otros signos clínicos o analíticos. Solamente en las acromegalias y en los adenomas hipofisarios los 17-cetoesteroides son normales hacia el límite alto de lo normal. Conviene insistir en que en estos casos de hiperfunción, por lo menos de alguna de las hormonas anterohipofisarias, los 17-cetos pueden ser normales. Esta experiencia nuestra coincide con lo generalmente admitido en la literatura.

En los síndromes primariamente gonadales, tanto masculinos como femeninos, tampoco la determinación de 17-cetos tiene valor diagnóstico decisivo. En los síndromes hipogonadales, las cifras son bajas, pero en dos casos de eunucoidismo son normales, si bien tirando a bajas. También son normales en las amenorreas primarias, en mujeres castradas o en trastornos del ciclo con insuficiencia ovárica. Únicamente en un síndrome de TURNER verdadero con agenesia ovárica, la cifra es baja, y en cuatro casos de amenorreas secundarias están en el límite alto de lo normal.

Para enjuiciar en su justo valor la determinación de los 17-cetoesteroides, en los síndromes endocrinos gonadales, hay que recordar que la aparición en la orina es en 2/3 expresión de la función de la corteza y que, por lo tanto, una insuficiencia o hiperfunción suprarrenal asociada o con papel etiológico en el proceso, puede influir más que el estado de las gonadas en las cifras bajas o altas que se encuentren. Tal podía ser la explicación de las cifras con tendencia alta de algunas amenorreas (por hiperfunción cortical) o las muy bajas de los panhipopituitarismos. También la castración puede cursar con cifras normales o elevadas, según el estado de la corteza.

Tanto en el Basedow como en el hipotiroidismo, los 17-cetos pueden ser normales. En el mixedema

manifiesto las cifras son bajas, coincidiendo con lo observado por BEIERWALTES y BISHOP⁵⁰. HUBBLE⁵¹ considera que el mixedema coexiste con una depresión de la corteza suprarrenal, no estando claro si esta acción depresora es directa o se ejerce a través de un descenso en la producción de adrenocorticotropina hipofisaria. Las cifras bajas en el bocio tóxico hiperfuncional se podrían explicar por la acción frenadora de la tiroxina sobre el lóbulo anterior (¿sobre TSH, ACTH?).

Por último, en la diabetes, las cifras son normales, excepto en los casos en que se asocia virilismo con hiperfunción suprarrenal.

Como resumen, vemos lo ya anteriormente dicho de la limitación de la dosificación de los 17-cetos

JAILER⁵⁵, dan valores extraordinariamente altos, con una interferencia grande de los cromógenos de la orina. ORTI y yo, trabajando durante más de dos años con estos métodos, llegamos igualmente a conclusiones negativas.

En cuanto a la dosificación del pregnandiol en orina, aparte del método gravimétrico de VENNING⁵⁶ para el glucuronidato de pregnandiol, son quizá los desarrollados en el laboratorio de MARRIAN⁵⁷ los que más garantías ofrecen en el momento actual. Transforman todo el pregnandiol en libre, lo purifican y colorimetran el color amarillo producido con el SO_2H_2 concentrado.

Podemos pues, decir, que tanto los métodos químicos de estrógenos como los de pregnandiol están

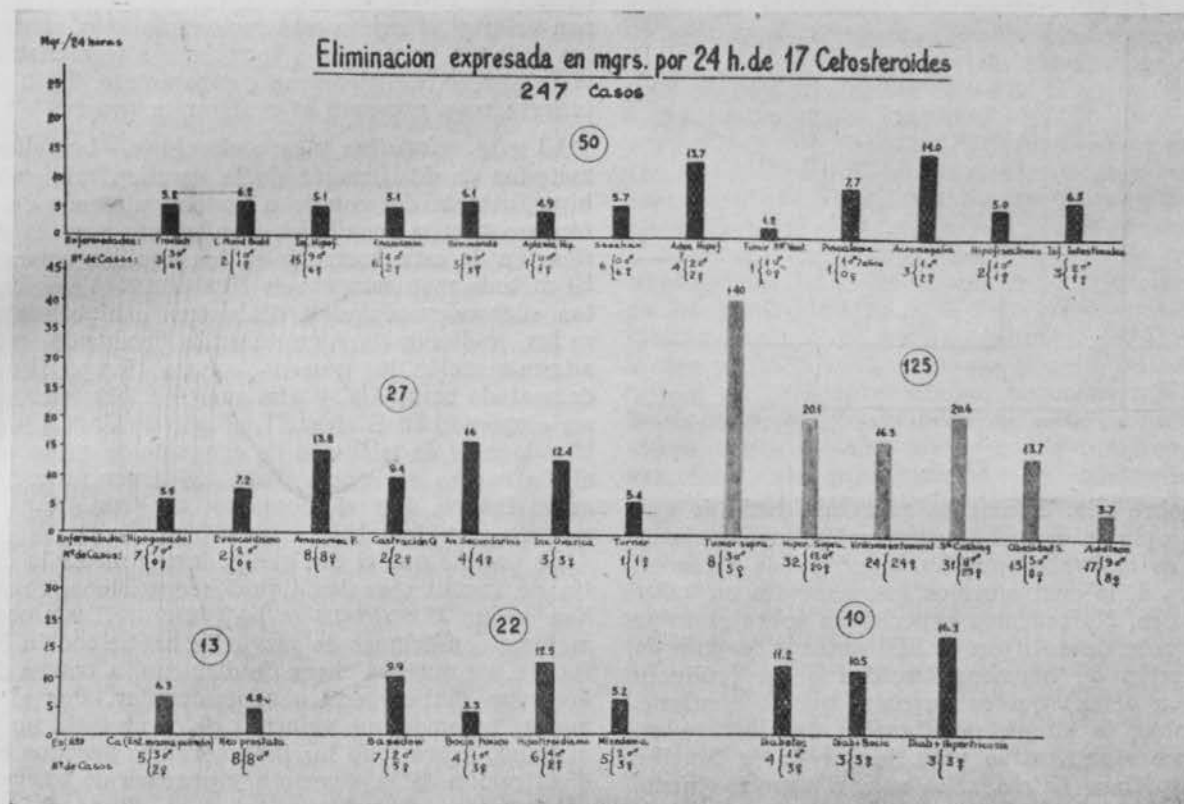


Fig. 3.

totales, quizá con excepción de los síndromes de hipofunción hipofisaria anterior que cursan con cifras constantemente bajas. Donde su valor diagnóstico es mayor es en los procesos suprarrenales, sobre lo que insistiremos ulteriormente.

9 y 10. **Estrógenos y pregnandiol.**—Los métodos biológicos más usados en la determinación de estrógenos en la orina están basados todos en el método de ALLEN y DOISY⁵², de producir cornificación del epitelio vaginal en la rata o ratona castradas, o en el de ASTWOOD⁵³, que mide el aumento de peso de útero de la rata impúber a las seis horas de la inyección. En todo caso los estrógenos de la orina están en su mayor parte esterificados, formando glucuronidatos, por lo que una hidrólisis previa es requisito indispensable.

En cuanto a los métodos químicos, podemos decir que todos cuantos existen en la actualidad dan resultados totalmente insatisfactorios. Los basados en la reacción de KOBER, ya colorimétricos como el de COHEN y BATES⁵⁴, ya fluorométricos, como el de

en completa evolución. Es de esperar, y hay evidencia de que eso es así, que en un futuro muy próximo dispongamos de métodos sensibles y exactos de medición de estas hormonas. Tanto más de desear cuanto que su dosificación es altamente útil en el embarazo, durante el ciclo menstrual normal y en todos los trastornos del mismo, tanto de la ovulación como de la formación y persistencia del cuerpo lúteo.

La mayor parte de los datos existentes en la literatura sobre estrógenos están dados con los métodos biológicos (ver¹ y²). Nosotros carecemos de experiencia personal sobre la dosificación de estas hormonas ni en los trastornos del ciclo ni tampoco en las afecciones hipofisarias.

11 y 12. **Iodo proteico (P. B. I.) y radio I en plasma.**—Hasta época relativamente reciente, no hemos dispuesto de métodos lo suficientemente sensibles para la dosificación de la hormona tiroidea. Hoy sabemos que la dosificación del iodo proteico del plasma equivale en un 85 a 90 por 100 a la me-

dida de la cantidad de tiroxina (Tx) y triiodotiroxina (Tr ITh) circulante, ya que son los únicos aminoácidos iodados que aparecen en la sangre. Su proporción relativa es tres a cuatro veces más Tx que Tr ITh, y ambas van unidas probablemente a la globulina α_1 . Son extraíbles por butanol, hecho conocido de muy antiguo, y dializables.

La determinación del iodo proteico de la sangre está considerado en la actualidad como un método, en muchos aspectos, más útil que el MB para juzgar la función tiroidea (ver²). Nuestra experiencia ha sido ya publicada⁵⁸ y⁵⁹, por lo que no insis-

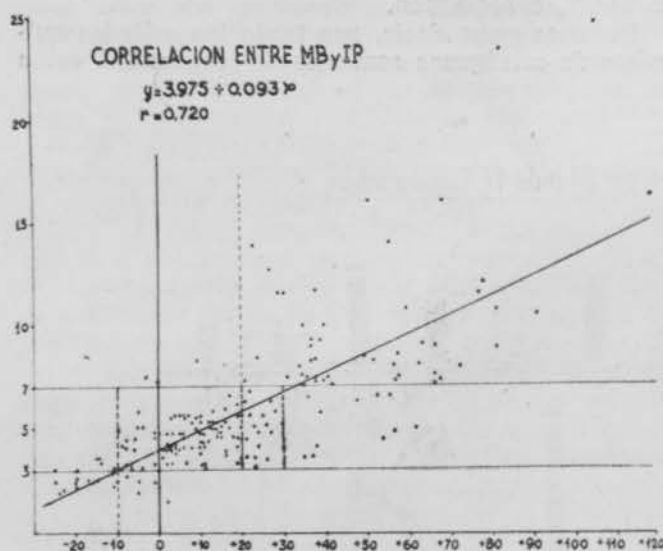


Fig. 4.

timos sobre ella. Solamente queremos resaltar que nuestra opinión es que la correlación con los datos de MB es bastante estrecha, como puede verse en la figura 4, lo cual creemos que aumenta su valor diagnóstico. No tenemos experiencia sobre el valor de la prueba de dosificar el PBI antes y después de la inyección de hormona tiroidea o un producto (sangre u orina) que se suponga que lo contiene. En cambio, la simple dosificación del PBI es un dato poco significativo para juzgar de la función de la hipófisis. Cifras altas son, a nuestro juicio, patognomónicas de hipertiroidismo, pero no nos dicen si éste es primario o secundario hipofisario. Únicamente parece ser que en el exoftalmos de origen hipofisario las cifras de PBI son normales (ver², pág. 124), lo que tendría valor diagnóstico. En las cifras bajas del hipotiroidismo o mixedema, su falta de elevación al administrar extractos hipofisarios sería signo de afectación primaria del tiroides (ver¹⁵, pág. 596).

De todas las pruebas que miden los distintos pasos metabólicos del I^{131} , sólo las que dosifican la radioactividad del plasma miden realmente la producción y suelta a la sangre de hormona tiroidea. Las pruebas de medición directa, sobre el tiroides, de aclaramiento de iodo, como la prueba tiroides-rodilla, o las de eliminación por la orina a distintos tiempos, como el llamado recientemente por FRASER y colaboradores⁶⁰ índice T, nos dan la medida de la captación del I por el tiroides, pero no del grado de liberación de hormona tiroidea.

Solamente los que miden la radiactividad tardía del plasma, y dentro de ellos, aun mejor, los de la fracción ligada a las proteínas, podemos considerarles como una determinación de la hormona circulante⁶¹. En este sentido, quizá el futuro esté reservado

a la combinación del método cromatográfico, ya sea en papel o en columna, con la medida de la radioactividad del plasma después de la administración de una dosis trazadora de I^{131} (62). En la técnica del papel, la tiroxina y triiodotironina radioactivas del plasma son revelados por autorradiografía. Después el mismo papel se revela por métodos químicos (ninhidrina) para poner de manifiesto el lugar que ocupan estas mismas sustancias no radioactivas añadidas al suero en cantidades conocidas. La coincidencia sirve para filiar aquellos compuestos. En la cromatografía en columna se mide en los elutos tanto la actividad radioactiva como la concentración química de las sustancias. Hoy por hoy, estos métodos no tienen aún aplicación clínica.

Queremos terminar diciendo que tanto la dosificación del PBI como las pruebas de radio I no tienen valor si el sujeto está recibiendo iodo, compuestos iodados orgánicos o inorgánicos, o sometido a tratamientos antitiroideos o tiroxicos. Esto debe tenerse muy presente al realizar la prueba.

13 y 14. *Insulina y catecolaminas.*—Los clásicos métodos de dosificación de la insulina midiendo la hipoglucemia del conejo o las convulsiones del ratón, no poseen sensibilidad suficiente para la dosificación de esta hormona en los líquidos orgánicos. El método más reciente de BORNSTEIN⁶³ emplea ratas adrenomeduladas, diabéticas e hipofisectomizadas, midiendo la hipoglucemia producida, previa administración de glucosa, en un tiempo fijo. Es demasiado complejo, y aún sujeto a discusión, para ser empleado en clínica. El método de GROEN y colaboradores⁶⁴ de medición de consumo de glucosa por el diafragma de rata aislado puede ser prometedor en el futuro. Por el momento, no pasa de ser un método experimental.

Es posible que el día que podamos medir la cuantía de insulina en los líquidos orgánicos, como lo han hecho BORNSTEIN y LAWRENCE⁶⁵, estemos en mejores condiciones de juzgar la participación hipofisaria, en muchos casos de diabetes, a través de la hormona diabetógena o contrainsular. Por el momento, tenemos que valernos de otros tests no hormonales, sobre todo los innumerables basados en la dosificación de la glucemia y pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina.

Algo parecido podemos decir de la dosificación de las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina. Hoy disponemos de métodos sensibles como el biológico, que emplea el ciego de pollo y presión arterial de gato de EULER y cols⁶⁶, o el fluorométrico de WEIL-MALHERBE y BONE⁶⁷, modificado posteriormente por MANGER⁶⁸. Con el primero, EULER ha visto grandes aumentos de aminos adrenérgicas en orina en el feocromocitoma. Con el método fluorométrico se han descrito supuestos valores en sujetos normales y su elevación en los hipertensos⁶⁹. Sin embargo, BARREDA, en nuestro Instituto, está lejos de ser tan optimista, en lo que a los métodos fluorométricos se refiere, siendo de la opinión que es un asunto que requiere aún mucho estudio y experiencia.

Como resumen, podemos decir que la dosificación de estas hormonas—insulina y catecolaminas—en sangre o en orina no ha entrado aún en la era clínica, por lo que su utilidad, hoy por hoy, es muy pequeña como método hormonal indirecto de estimación de la función hipofisaria.

Esteroides corticales.—De todas las determinaciones hormonales de los productos de secreción de las

principales glándulas efectoras, sujetas a la acción de las trofinas hipofisarias, son las que miden la acción de los esteroides de la corteza las que más importancia pueden tener para juzgar de la función de la hipófisis anterior. Además, el hecho de que hoy dispongamos de ACTH pura, y en cantidades asequibles, hace que podamos estudiar en las suprarrenales, mejor que en ninguna otra glándula, la respuesta que la inyección de su hormona trófica específica irroga en la secreción y eliminación de sus hormonas.

En tres grupos podemos clasificar éstas. Los llamados mineralcortitoides, los glucocortitoides y los esteroides androgénicos. Basados en sus principales efectos metabólicos de retención de Na, de intervenir en la regulación del azúcar ("sugar") o de favorecer el anabolismo del N, han sido también llamados, respectivamente, factores Na, S y N. En la corteza existen tres capas histológicamente diferentes: glomerular, fasciculada y reticular, que segregarían, respectivamente, las factores Na, S y N, aunque actualmente se duda mucho de que esta división histológica sea tan tajante y específica. Hoy parece lo más probable que las tres zonas estén bajo la acción de la ACTH y, por lo tanto, la excitación por esta hormona produce aumento de los tres grupos de esteroides. Este aumento es, sin embargo, más específico en el caso de los glucocortitoides que en los otros dos grupos de compuestos.

Esteroides androgénicos. — Los esteroides androgénicos aparecen en la orina como 17-cetoesteroides. No todos ellos tienen clara función androgénica, sino que parte son productos del metabolismo de la 17-hidroxycorticosterona o hidrocortisona. En todo caso, constituyen los 2/3 de los 17-cetos totales de la orina, por lo que esta determinación donde tiene más valor diagnóstico es en la diferenciación de los síndromes córticosuprarrenales. En el síndrome de Cushing producido por adenoma basófilo hipofisario, o lo que es mucho más frecuente, debido a hiperplasia intensa de las suprarrenales, se ha descrito que los 17-cetos pueden ser normales o incluso bajos (ver² pág. 227). En nuestra experiencia, suelen estar elevados, tanto en hombres como en mujeres, donde el síndrome es mucho más frecuente (fig. 3). En las hiperplasias suprarrenales son también a tos, aunque no excesivos. Las cifras más altas las hemos encontrado siempre en los tumores, donde pueden llegar a 600 mg. diarios. Este simple hecho creemos que tiene ya un gran valor diagnóstico. Una cifra elevada (por encima de 30 mg.) debe hacernos pensar en un tumor. Elevada, pero ligeramente por encima de lo normal, en una hiperplasia suprarrenal, un Cushing o una virilización suprarrenal. En el límite alto de lo normal se encuentran los virilismos ligeros en mujeres, aunque muchas veces estos cuadros cursan con cifras normales. Otros cuadros en que se sospeche una hiperfunción suprarrenal (obesidades, diabetes), suelen tener 17-cetos normales en orina. En cambio, en los Addison (17 casos), encontramos sistemáticamente cifras descendidas (por debajo de 6 mg., más en las mujeres que en los hombres). Aunque una cifra baja de 17-cetos no es patognomónica del Addison, una cifra normal o aumentada excluye automáticamente la enfermedad. Esto tiene importancia en casos dudosos y, sobre todo, en el diagnóstico diferencial con la hemocromatosis, ya que en nuestra experiencia de cinco de estos casos, cuatro cursaron con cifras altas y uno en el límite alto de lo normal.

La dosificación de los 17-cetoesteroides urinarios después de la administración de ACTH tiene un valor diagnóstico decisivo diferencial del Addison con el panhipopituitarismo. En el segundo caso, los 17-cetos aumentan al estimularse la corteza no totalmente atrofiada. En el Addison la respuesta es negativa. Esta prueba suele hacerse en la actualidad simultánea con la dosificación de los 17-hidroxycortitoides, que constituyen la expresión más específica de la eliminación de los glucocortitoides por la orina. Luego insisteremos sobre ella así como su valor en casos de hiperfunciones.

Recientemente se ha propuesto una prueba, basada en la dosificación de 17-cetoesteroides, que diferenciaría las hiperplasias suprarrenales de los tumores de la glándula u ováricos acompañados de virilización⁷⁰. Consiste en inyectar 100 mg. diarios de acetato de cortisona durante seis días. Al final de este período, en las simples hiperplasias se produce un descenso de las cifras de 17-cetos. Estas no se modifican en los tumores.

15. Reacción de Allen-Patterson. — Ya hemos dicho que entre los 17-cetoesteroides existen los α y β , esteroides que se diferencian en la posición estereoisómera del grupo alcoholico OH en el carbono 3. Los representantes más característicos de los α -esteroides son la androsterona y la etiolanolona; de los β -esteroides lo es la dehidroisoandrosterona. Normalmente, el 85 por 100 del color de la reacción lo dan los α -esteroides, ya que la dehidroisoandrosterona está sólo presente en pequeñas cantidades. En las afecciones suprarrenales, esta proporción se altera, pero es sobre todo en los tumores donde aumentan extraordinariamente los β -cetoesteroides y, sobre todo, la dehidroisoandrosterona.

En estos casos, puede interesar la dosificación fraccionada de los α y β esteroides por precipitación con digitonina, como en el método de FRAME⁷¹, o seguir el método de PINCUS⁷² del triclورو de antimonio, cuya reacción no la da la dehidroisoandrosterona. Pero éstos son métodos complicados, por lo que siendo el aumento específico de este esteroide el que tiene más valor diagnóstico diferencial, nos interesa considerar los métodos que demuestren un aumento selectivo del mismo.

PATTERSON, en 1947⁷³, aplicó a la práctica una reacción, descrita por DIRSCHERL y ZILLIKEN⁷⁴ en 1943, como muy específica de la dehidroisoandrosterona. Posteriormente, ALLEN⁷⁵ modificó la reacción.

NIELSEN y cols.⁷⁶ han desarrollado un método cuantitativo de dosificación de dehidroisoandrosterona basado en esta reacción. Nosotros hemos realizado la reacción cualitativa, a la que llamamos reacción de ALLEN-PATTERSON, quizá olvidando injustamente a sus primeros descubridores. Su técnica es la que sigue:

A una fracción de la orina de 24 horas, generalmente 25 c. c. recogida sin necesidad de sustancias protectoras, se le añaden 0,75 c. c. de SO_2H_2 concentrado y se hidroliza bajo refrigerante de reflujo 30 minutos.

Se enfría y se extrae una vez con 40 c. c. de éter sulfúrico libre de peróxidos. Se lava con 10 c. c. de NaOH al 10 por 100, a los que se le añade una punta de cuchillo de hidrosulfito sódico. Se agita vigorosamente por lo menos dos minutos. Se lava con H_2O y se seca con sulfato sódico anhidro. Se evapora a sequedad y se añaden 2 c. c. del reactivo de ALLEN (1 volumen alcohol 96° y 4 volúmenes de SO_2H_2 concentrado).

Se calienta 12 minutos a 55°, se enfría y se añaden 4 c. c. de alcohol de 95°.

CUADRO IV

RESULTADO DE LA REACCION DE ALLEN-PATTERSON EN 27 ENFERMOS CON PROCESOS CORTICOSUPRARRENALES Y ELIMINACION DE 17-CETOESTEROIDES ELEVADA

DIAGNOSTICOS	Número de casos	Negativa	Positiva	
			Débil	Fuerte
Tumores adrenales	8	—	—	8
Tumor testicular	1	1	—	—
Cushing o hiperplasias	5	1	4	—
Virilismos e hiperfunciones	13	12	1	—

Con esta técnica hemos realizado la reacción en 27 enfermos con procesos córticosuprarrenales y cifras de 17-cetoesteroides aumentados, cuyos resultados se ven en el cuadro IV. En los ocho casos de

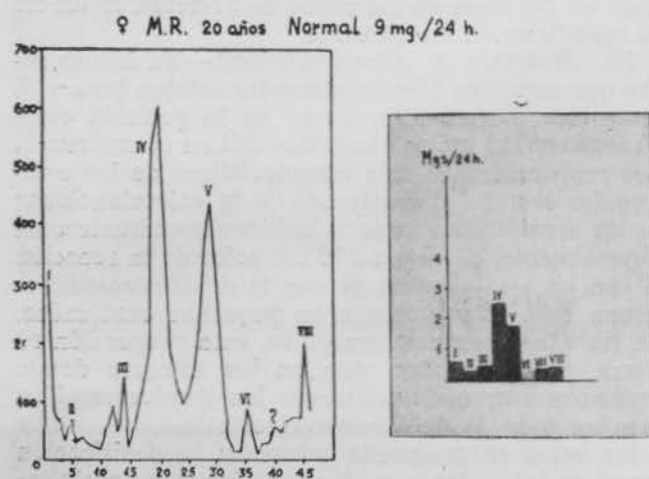


Fig. 5.

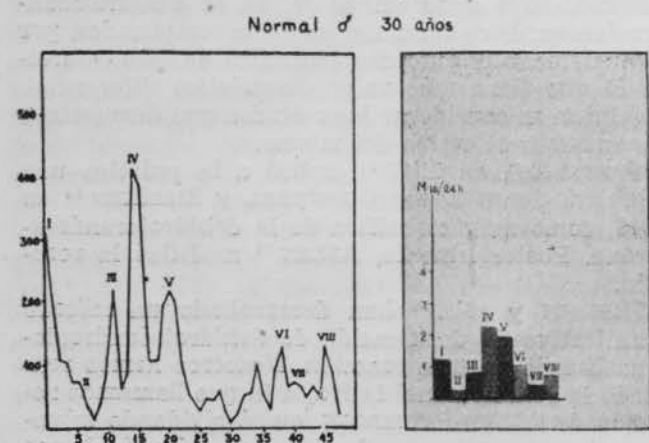


Fig. 6.

tumores, de los cuales siete fueron confirmados por la operación o necropsia, la reacción fué fuertemente positiva. En un caso de tumor testicular muy androgénico, la reacción fué negativa, probablemente porque las células de Leydig no segregan dehidroisandrosterona. Débilmente positiva fué en cuatro casos de hiperplasia y en uno de virilismo por hiperfunción suprarrenal. En el resto (13 casos) fué constantemente negativa. Nuestra opinión es por tanto que se trata de una reacción muy sencilla que no requiere reactivos ni aparatos especiales y que tiene un gran valor diagnóstico diferencial entre los

tumores y las simples hiperplasias o hiperfunciones corticales. En casos dudosos, podría hacerse o la reacción cuantitativa o la separación de los 17-cetoesteroides por el método a que ahora nos referimos.

16. *Cromatografía de los 17-cetoesteroides.* — Fué DINGEMANSE⁷⁷ la primera que publicó una técnica de cromatografía en columna de los 17-cetoesteroides totales. Posteriormente, DOBRINER⁷⁸ y POND⁷⁹ han desarrollado otras técnicas más o menos similares. Durante todo el año 1954 ORTI, en mi Sección del I. I. M., trabajó y puso a punto el método de DINGEMANSE. Posteriormente, ARRIETA, conmigo, hemos continuado con el método, obteniendo algunos resultados interesantes que pueden verse en las figuras 5 a 9.

La figura 5, es un cromatograma de una mujer, y la 6, de un hombre normal. La figura 7 corres-

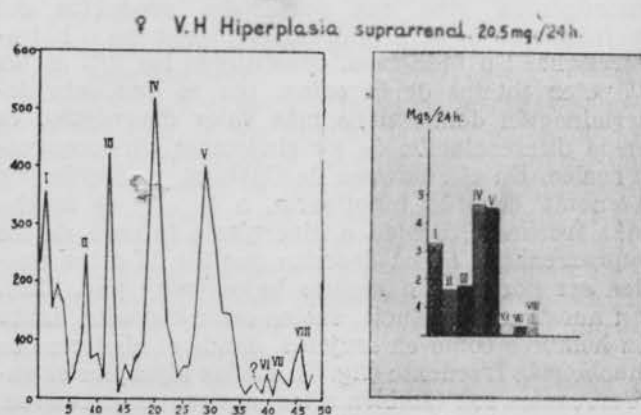


Fig. 7.

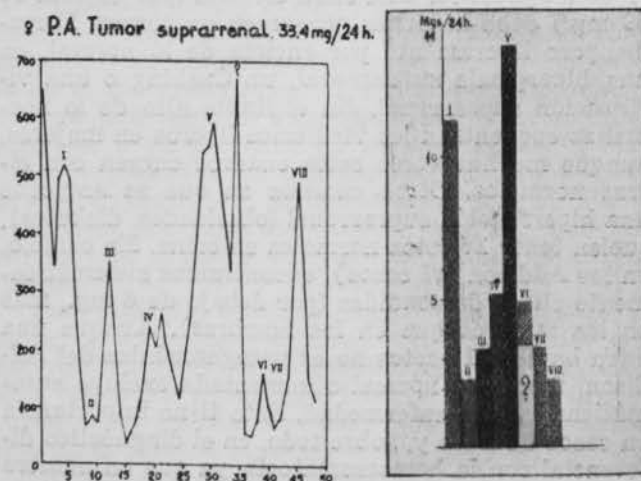


Fig. 8.

ponde a un caso de hiperplasia suprarrenal con virilización. Las figuras 8 y 9 corresponden a dos casos de carcinoma suprarrenal, comprobados en necropsia. La significación de las ocho fracciones corresponde en todo a la dada por DINGEMANSE y colaboradores.

En principio, existe en los casos de tumor un descenso proporcional de la androsterona (IV) con aumento también proporcional de la etiocolanona (V). Pero esto no es específico, sino que es característico del Cushing y otras hiperfunciones corticales. Todas las fracciones están aumentadas, pero en proporción a lo normal mucho más la II y III (dehidroisoandrosterona) y la VI y VII, de claro origen suprarrenal. La fracción I se debe en gran parte a productos formados durante la hidrólisis y la extracción, que aparecen como 17-cetos no alcohólicos en C_3 y derivados clorados. La VIII corresponde a 17-cetos no bien identificados. Nuestra experiencia con este método es aún escasa, pero creemos que puede tener gran valor en el futuro no sólo en el diagnóstico de los procesos suprarrenales hiperfuncionales, sino también para juzgar acerca de la eliminación de los diferentes 17-cetoesteroides en otras afecciones endocrinas (hipofisarias, gonadales) o no endocrinas (cánceres, procesos hepáticos, etcétera).

17. *Mineralcorticoide*s.—No existe ningún método químico específico de dosificación de la desoxicorticosterona. ORTI, en nuestro Instituto, descubrió una reacción con fluorescencia roja característica de la DOCA, pero su desarrollo y aplicación ulterior ha estado llena de dificultades.

Los métodos para juzgar de la función mineralcorticoide se basan en el estudio del equilibrio electrolítico, sobre todo del Na y K, en sangre y orina. Recientemente se ha propuesto la dosificación de estos iones en el sudor^{80, 81 y 82} como prueba más sensible. En todo caso, el análisis de estos métodos se sale de los límites de esta revisión, aparte de que sin duda este grupo de esteroides es el menos sensible al estímulo adrenocortical hipofisario. El descubrimiento reciente de la electrocortina o aldosterona (REICHSTEIN, 1953) ó 18-hidroxi-11 desoxicorticosterona, quizá permita en el futuro disponer de una dosificación hormonal directa de esta importante función de las suprarrenales (*).

18 y 19. *Glucocorticoide*s.—Los esteroides de la corteza de acción glucogénica son quizá los más importantes, tanto en lo que respecta a la función hormonal, propia de la glándula, como a su estrecha interdependencia con la hormona adrenocorticotropa hipofisaria o ACTH.

Todo este grupo se caracteriza por tener un O o un OH en el C_{11} y un α -cetol grupo $CH_2.CO.CH_2.OH$ de cadena lateral, con un total de 21 átomos de C. Aquellos esteroides con sólo un $-OH$ o un $=O$ en el carbono 11, son la corticosterona y la 11-dehidrocorticosterona. Los que además tienen un OH en el C 17 son la 17-hidroxycorticosterona (hidrocortisona) y la 11-dehidro-17-hidroxycorticosterona (cortisona).

Por eso existe cierta confusión entre los diferentes métodos propuestos para la dosificación de estos compuestos. El método de VENNING⁸³ es biológico y consiste en medir el depósito de glucógeno

en el hígado de ratones en ayunas hipofisectomizados. Se expresan los resultados en unidades glucogénicas (G. U.). Una G. U. equivale a 1 $\mu g.$ de cortisona. Existen otros métodos biológicos, pero han sido menos usados. El método de VENNING es muy sensible y exacto, pero tiene el inconveniente de no ser aplicable a la rutina clínica, a pesar de que existe bastante experiencia clínica con el mismo^{84 y 85}.

Por eso, en estos últimos años, se han descrito diferentes métodos químicos de determinación de estos esteroides. Tres han sido los principales:

1) Los métodos de reducción o de dosificación

♀ M. del C. Tumor suprarrenal 28 mg/24 h.

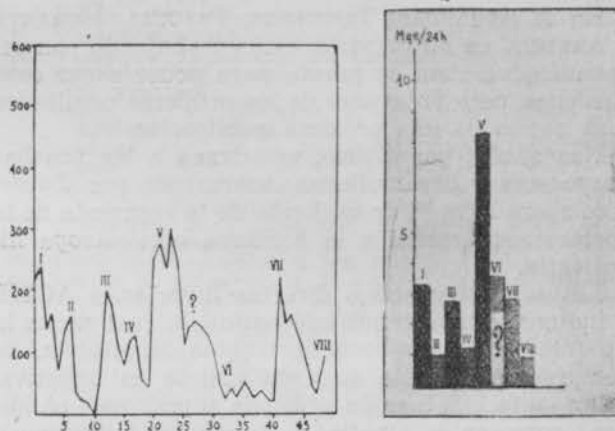


Fig. 9.

de "esteroides reductores" u 11-oxiesteroides, basados en la reducción de compuestos de cobre (TALBOT y cols.⁸⁶) o del ácido fosfomolibdico (HEARD y SOBEL⁸⁷). Nosotros hemos trabajado con este último método en orina con resultados muy altos y poco seguros.

2) Los de determinación de los llamados "esteroides formaldehidogénicos", que liberan formaldehído bajo la acción del ácido periódico⁸⁸. Este método mide esteroides glucogénicos y no glucogénicos, por lo que ha sido muy criticado.

Parecido a éste es el método de NORBYERSKI y colaboradores⁸⁹, que transforma estos esteroides en 17-cetoesteroides, tratando la orina con bismutato sódico y dosificando las 17-cetos totales antes y después; a estos esteroides se les llama "esteroides 17-cetogénicos".

Pero los métodos hoy más usados son los que dosifican los 17-hidroxycorticosteroides, es decir, la cortisona e hidrocortisona, pues son los esteroides más activos de este grupo. Estos métodos están basados en la llamada reacción de PORTER-SILBER, donde se mide el color que desarrollan con un reactivo mezcla de ácido sulfúrico y fenilhidrazina. Las técnicas de REDDY y cols.⁹⁰, SMITH y los suyos⁹¹ (para orina) y la de NELSON y SAMUELS⁹², han sido las más empleadas, esta última habiendo sido aplicada a sangre mediante cromatografía previa con "florsil".

Las dosificaciones de los 17-hidroxycorticosteroides en sangre han demostrado que los valores normales oscilan alrededor de 10 $\mu g.$ por 100 c. c. de plasma^{93, 94 y 95}. Durante el embarazo aumentan hasta el momento del parto, en que vuelven a lo normal en una semana^{93 y 94}. En el Cushing están muy aumentados y en el Addison prácticamente no existen⁹⁵. En el hipopituitarismo, los valores tien-

(*) Hoy existen métodos para dosificar la aldosterona basados en la medición de las alteraciones del cociente Na/K en la orina de ratas adrenalectomizadas a las que se inyectan las sustancias o problemas a ensayar^{86 y 90}.

den a bajos y lo mismo ocurre en la diabetes insípida. Los valores más altos se han hallado en los tumores suprarrenales⁹⁴.

En todos los casos en que existe una causa de "stress", las cifras son también elevadas. Pocos datos existen sobre la eliminación de 17-OH por la orina aparte de los proporcionados por REDDY y SMITH. Ambos encuentran valores de 0 en el Addison y cifras elevadas en los síndromes de Cushing, aunque sus valores no son comparables. Normalmente la eliminación oscilaría entre 3 y 12 mg./24 horas, siendo menor durante la noche y aumentando en el día. Por la misma razón, las dosificaciones en sangre deben hacerse por la mañana en condiciones basales.

En la actualidad, TRIGUEROS, PASCUAL, MORANTE y ARRIETA, en mi Servicio, están trabajando con estos métodos. Aún es pronto para poder sacar conclusiones, pero un avance de los primeros resultados será objeto de una próxima publicación¹⁰⁰.

Nos queda, por último, referirnos a las pruebas propuestas y desarrolladas, sobre todo por THORN y colaboradores⁹⁶, de medición de la respuesta de la corteza suprarrenal a la hormona corticotropa hipofisaria.

Estas pruebas son o directas inyectando ACTH, o indirectas inyectando adrenalina, la cual excita la producción de adrenocorticotropina hipofisaria. Se comprende que esta segunda prueba es negativa, tanto en la hipofunción primaria suprarrenal (Addison) como en la hipofisaria (panhipopituitarismo). En cambio, la del ACTH es positiva en este último caso (siempre que la corteza no sufra una atrofia secundaria total) y negativa en el Addison. La combinación de las dos puede ser de gran utilidad en el diagnóstico del estado funcional de la hipófisis, en lo que ACTH se refiere.

La respuesta se mide por uno de estos tres medios: Eosinopenia producida, aumento de los 17-cetosteroides o aumento de los 17-hidroxycorticoles en sangre o en orina. El primer procedimiento ha sido el más usado por su sencillez. Normalmente la eosinopenia es de un 90 a 100 por 100, mientras que en el Addison no llega al 20 por 100. Un descenso que no pase del 50 por 100, debe hacernos sospechar un cierto grado de insuficiencia suprarrenal. Infinidad de técnicas y modificaciones han sido propuestas que no vamos a detallar.

La medición de la respuesta por el aumento de 17-cetos ó 17-hidroxi en la orina es más reciente²¹ y⁹⁷. Normalmente los 17-cetos aumentan en 4-8 mg. en 24 horas. El aumento de 17-hidroxi es aún mayor, pudiendo llegar a los 30 mg./24 horas. Estos aumentos se producen igualmente en la insuficiencia adrenal puramente hipofisaria y son negativos en el Addison.

La prueba puede hacerse por inyección intravenosa de 25 mg. de ACTH, en infusión continua, durante 8 horas, en dos días consecutivos. Medición de 17-cetos y 17-hidroxi en el día control y los dos días siguientes. Es el llamado test de las 8 horas intravenoso. La prueba de las 4 horas es más rápida y en ella se inyectan 25 mg. de ACTH por vía intramuscular. Se suele medir la eosinopenia. El test de las 48 horas intramuscular es más largo y menos seguro. Se inyectan 10 mg. de ACTH intramuscular, cada seis horas, durante 48 horas, y se dosifican ambos 17-esteroides antes y en las segundas 24 horas de la prueba. La prueba intravenosa es con mucho la mejor, la más fiel y la más

empleada. La inyección intramuscular con gel retardada es también muy activa.

La prueba del ACTH no sólo tiene valor diagnóstico en las hipofunciones suprarrenales. También en las hiperfunciones, si éstas se deben a una hiperplasia suprarrenal, la respuesta es activa. Los tumores, en cambio, suelen no responder. Sin embargo, en las hiperfunciones no tiene la prueba valor patognomónico como en las hipofunciones, aparte de que cómo es difícil evaluar, si la respuesta ha sido exagerada, no permite diferenciar si, por ejemplo, un síndrome de Cushing es primitivamente hipofisario o suprarrenal. Esta limitación diagnóstica en las hiperfunciones de las glándulas efectoras la hemos visto, por otra parte, en todos los métodos indirectos de dosificación hormonal que hemos analizado.

* * *

Podemos terminar como conclusión de todo lo expuesto lo siguiente: Es verdad que en el diagnóstico de las enfermedades hipofisarias, como en el de otras enfermedades endocrinas, el examen clínico y la anamnesis de los enfermos serán fundamentales para el diagnóstico del proceso. Pero también es cierto que en estos últimos tiempos la Endocrinología ha evolucionado, poniendo a nuestra disposición una serie de métodos auxiliares de dosificación hormonal que no debemos rechazar. Hoy estamos en mejores condiciones que hace diez años para poder dilucidar con estos métodos los diagnósticos dudosos o para confirmar los obtenidos por datos puramente clínicos. Las dosificaciones de hormonas no son una panacea, y técnicamente, cuando no son difíciles, son por lo menos delicadas y requieren experiencia y a veces dispositivos especiales. De todas ellas, la dosificación de gonadotropinas, la hormona o sustancia antidiurética, los 17-cetosteroides, los 17-hidroxycorticoles y las pruebas de respuesta al ACTH, son quizá las más útiles para juzgar del estado funcional de la hipófisis. Pero no olvidemos que la interpretación de sus datos deberá hacerse siempre en relación con los hallazgos clínicos. De esta forma, serán útiles en el diagnóstico de los procesos endocrinos en general y de los hipofisarios en particular.

BIBLIOGRAFIA

1. EMMENS, C. W.—Hormone Assay. Academ. Press Publ. New York, 1950.
2. WILLIAMS, R. H.—Textbook of Endocrinology. Saunders, 1950.
3. KLINEFELTER, H. F., ALBRIGHT, F. y GRISWOLD, G. C.—J. Clin. Endocrinol., 3, 529, 1943.
4. MADDOCK, W. O. y HELLER, C. G.—Endocrinology, 41, 177, 1947.
5. JUNGCK, E. C., MADDOCK, W. O. y HELLER, C. G.—J. Clin. Endocrinol., 7, 1, 1947.
6. BUTT, W. R. y CROOKE, A. C.—Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. London, vol. V, pág. 44 y J. Endocrinol., 9, 41, 1953.
7. CROOKE, A. C., BUTT, W. R., INGRAM, J. D. y ROMANCHUCK, L. E.—Lancet, 1, 379, 1951.
8. MOORE, S. y STEIN, W. H.—J. Biol. Chem., 176, 367, 1948.
9. RIMINGTON, C.—Biochem. J., 34, 931, 1940.
10. ALBRIGHT, F., FORBES, A. P., FRASER, A., MILLER, R. B. y REUFENSTEIN, E. E.—1941.
11. KLINEFELTER, H. F., REUFENSTEIN, E. C. Jr. y ALBRIGHT, F.—J. Clin. Endocrinol., 2, 615, 1942.
12. CASTILLO, E. B., TRABUCCO, A. y DE LA BALZE, A.—J. Clin. Endocrinol., 7, 493, 1947.
13. ORTI, E.—Rev. Clin. Esp., 37, 1, 1950.
14. LYONS, W. R. y PAGE, E.—Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 32, 1,049, 1935.
15. HARRISON, T. R.—Principles of Internal Medicine, cap. 85, pág. 601 y cap. 87, págs. 610-615. Blakiston Co., 1954.

16. RAWSON, R. W. y STARR, P.—Arch. Int. Med., 61, 726, 1938.
17. EVANS, H. M., SIMPSON, M. E., MARX, W. y KIBRICK, E. A.—Endocrinology, 32, 13, 1943.
18. GREENSPAN, F. S., LI, C. H., SIMPSON, M. E. y EVANS, H. M.—Endocrinology, 45, 455, 1949.
19. FRIEDBERG, F. y GREENBERG, D. M.—Arch. Biochem., 17, 193, 1948.
20. SAYERS, M. A., SAYERS, G. y WOODBURY, L. A.—Endocrinology, 42, 379, 1948.
21. REICANT, L., HUME, D. M., FORSHAM, P. H. y THORN, G. W.—J. Clin. Endocrinol., 10, 187, 1950.
22. WARING, H. y KETTERER, B.—Nature, 171, 862, 1953.
23. CABALLERO, J.—Bol. Inst. Pat. Méd., 9, 209, 1954.
24. LANDGREBE, F. W. y WARING, H.—En Hormone Assay. Emmens. Acad. Publ. N. Y., 1950, pág. 141.
25. HARRISON, T. R.—Principles of internal medicine, página 609. Blakiston Co., 1954.
26. HAMILTON, H. C. y ROWE, L. W.—J. Lab. a. Clin. Med., 2, 120, 1916.
27. ROWE, L. W.—Endocrinology, 13, 205, 1929.
28. DALE, H. H. y LAIDLAW, P. P.—J. Pharmacol. a. Exp. Therap., 4, 75, 1912-13.
29. RAAB, W.—Hormonal and neurogenic cardiovascular disorders. Williams and Wilkins. Baltimore, 1953.
30. BURN, J. H.—Quart. J. Pharm. a. Pharmacol., 4, 517, 1931.
31. GROLLMAN, A. v WOODS, B.—Endocrinology, 44, 409, 1949.
32. RALLI, E. P., LESLIE, S. H., STUECK, G. H. y LAKEN, B. Am. J. Med., 11, 157, 1951.
33. BIRNIE, J. W., JENKINS, R., EVERSOLE, W. J. y CAUNT, R.—Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 70, 83, 1949.
34. BIRNIE, J. H., BOSS, W. R., OSBORN, C. M., CAUNT, R. y EVERSOLE, W. I.—Endocrinology, 47, 1, 1950.
35. GROLLMAN, A.—Essentials of Endocrinology. Lippincott, 1947.
36. DU VIGNEAUD, V., RESSLER, C., SWAN, J. M., ROBERTS, C. W. y GORDON, S.—Science, 118, 543, 1953.
37. MATHIESON, D. R. y HAYS, H. W.—Endocrinology, 37, 275, 1945.
38. FRANK, R. T., KLEMPNER, E., HOLLANDER, F. y KRISS, E.—Endocrinology, 31, 63, 1942.
39. DORFMAN, R. I.—Endocrinology, 42, 1, 1948.
40. CALLOW, N. H., CALLOW, R. K. y EMMENS, C. W.—Biochem. J., 32, 1312, 1938.
41. CALLOW, N. H., CALLOW, R. K., EMMENS, C. W. y STROUD, S. W.—J. Endocrinol., 1, 77, 1939.
42. HOLTORFF, A. F. y KOCH, F. C.—J. Biol. Chem., 135, 377, 1940.
43. MEDICAL RESEARCH COUNCIL.—Committee on clinical Endocrinology. Lancet, 2, 585, 1951.
44. DREKTER, I. J., PEARSON, S., BARTZAK, E. y Mc GAVACK, T. H.—J. Clin. Endocrinol., 7, 795, 1947.
45. CALLOW, R. K.—En el Emmens Hormone Assay, página 363, 1950.
46. PINCUS, G. y PEARLMAN, W. H.—Endocrinology, 29, 413, 1941.
47. BUTT, W. R., HENLY, A. A. y MORRIS, C. J.—Biochem. J., 42, 447, 1948.
48. PINCUS, G.—Endocrinology, 32, 176, 1943.
49. SALTER, W. T., CAHEN, R. L. y SAPPINGTON, T. S.—J. Clin. Endocrinol., 6, 52, 1946.
50. BEIERWALTES, W. H. y BISHOP, R. C.—J. Clin. Endocrinol., 14, 928, 1954.
51. HUBBLE, D.—Lancet, 1, 1, 1955.
52. ALLEN, E. y DOISY, E. A.—J. Am. Med. Ass., 81, 819, 1923.
53. ASTWOOD, E. B.—Endocrinology, 23, 25, 1938.
54. COHEN, H. y BATES, R. W.—J. Clin. Endocrinol., 7, 707, 1947.
55. JAILER, J. W.—J. Clin. Endocrinol., 8, 564, 1948.
56. VENNING, E. H.—J. Biol. Chem., 126, 595, 1938.
57. SOMMERVILLE, I. F., GOUGH, N. y MARRIAN, G. F.—J. Endocrinol., 5, 247, 1948.
58. VIVANCO, F., RAMOS, F. y PALACIOS, J. M.—Rev. Clin. Esp., 48, 7, 1953.
59. VIVANCO, F. y RAMOS, F.—Rev. Clin. Esp., 54, 208, 1954.
60. FRASER, R., HOBSON, Q. J. G., ARNOTT, D. G. y EMERY, E. W.—Quart. J. Med., 22, 99, 1953.
61. WOOTTON, I. D. P., MILNE, M. D. y KING, E. J.—Ann. Rev. Biochem., 23, 444, 1954.
62. GROSS, J.—Brit. Med. Bull., 10, 218, 1954.
63. BORNSTEIN, J.—Brit. Med. J., 1, 732, 1951.
64. WILLEBRANDS, GROEN, KAMMINGA y BLICKMAN.—Science, 112, 277, 1950.
65. BORNSTEIN y LAWRENCE.—Brit. Med. J., 2, 1541, 1951.
66. ENGEL, A. y von EULER, U. S.—Lancet, 259, 387, 1950.
67. WEIL-MALHERBE, H. y BONE, A. D.—Lancet, 264, 974, 1953.
68. MANGER, W. M., BALDES, E. J., FLOCK, E. V., BOLLMAN, J. L. y BERKSON, J.—Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 28, 526, 1953.
69. MANGER, W. M.—Circulation, 10, 641, 1954.
70. THORN, G. W., FORSHAM, P. H. y LAIDLAW, J. C.—En HARRISON, "Principles of Internal Medicine", página 645, 1954.
71. FRAME, E. G.—Endocrinology, 34, 175, 1944.
72. PINCUS, G.—Endocrinology, 32, 176, 1943.
73. PATTERSON, J.—Lancet, 253, 580, 1947.
74. DIRSCHERL, W. y ZILLIKEN, F.—Naturwissenschaften, 31, 349, 1943.
75. ALLEN, W. M., HAYWARD, S. J. y PINTO, A.—J. Clin. Endocrinol., 10, 54, 1950.
76. NIELSEN, A. T.—Acta Endocrinol. Copenhagen, 1, 121, 1948.
77. DINGEMANSE, E., HUISNT VELD, L. G. y DE LAAT, B. M. J. Clin. Endocrinol., 6, 535, 1946.
78. LIBBERMAN, S. y DOBRINER, K.—Recent Progress in Hormone Research, 3, 71. Acad. Press N. Y., 1948.
79. FOND, M. H.—Lancet, 2, 906, 1951.
80. LESLIE, A. y LEVINE, M. H.—Am. J. Med., 8, 823, 1950.
81. LOCKE, W., TALBOT, N. B., JONES, H. S. y WORCESTER, J.—J. Clin. Invest., 30, 325, 1951.
82. CONN, J. V. W. y LOUIS, L. H.—J. Clin. Endocrinol., 10, 12, 1950.
83. VENNING, E. H., KAZMIN, V. E. y BELL, J. C.—Endocrinology, 38, 79, 1946.
84. VENNING, E. H. y KAZMIN, V. E.—Endocrinology, 39, 131, 1946.
85. VENNING, E. H. y BROWNE, J. S. L.—J. Clin. Endocrinol., 7, 79, 1947.
86. TALBOT, N. B., SALTZMAN, A. H., WIXOM, R. L. y WOLFE, J. K.—J. Biol. Chem., 160, 555, 1945.
87. HEARD, R. D. H. y SOBEL, H.—J. Biol. Chem., 165, 687, 1946.
88. DAUGHADAY, W. H., JAFFE, H. y WILLIAMS, R. H.—J. Clin. Endocrinol., 8, 166, 1948.
89. NORYMBERSKI, J. K.—Nature, 170, 1074, 1952.
90. REDDY, J., JENKINS, D. y THORN, G. W.—Metabolism, 1, 511, 1952.
91. SMITH, R. W., MELLINGER, R. C. y PATTI, A. A.—J. Clin. Endocrinol., 14, 336, 1954.
92. NELSON, H. y SAMUELS, L.—J. Clin. Endocrinol., 12, 519, 1952.
93. BAYLISS, R. I. S., BROWNE, J. C., ROUND, B. y STEINBECK, A. W.—Lancet, 1, 62, 1955.
94. GENZELL, C. A.—J. Clin. Endocrinol., 13, 898, 1953.
95. PERKOFF, G. T., SANDEBERG, A. A., NELSON, H. y TYLER, F. H.—Arch. Int. Med., 93, 1, 1954.
96. THORN, G. W., FORSHAM, P. H. y EMERSON, K.—The diagnosis and treatment of adrenal insufficiency. Springfield Thomas, 1951.
97. THORN, G. W., FORSHAM, P. H., PRUNTY, F. T. G. e HILLS, A. G.—J. Am. Med. Ass., 137, 1005, 1948.
98. COPE, C. L. y GARCÍA LLAUDADÓ, J.—Brit. Med. J., 1, 1290, 1954.
99. GARCÍA LLAUDADÓ, J.—Rev. Clin. Esp., 58, 343, 1955.
100. MORANTE, M., VIVANCO, F., TRIGUEROS, F., PASCUAL, R. y ARRIETA, F.—(En publicación.)