

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Respuesta hipofisaria de FSH, LH, PRL, TSH, HGH y
cortisol a un estímulo en humanos pre y post púberes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Sara-L. Mola Pereda

DIRECTOR:

Jorge Tamarit Torres

Madrid, 2015

R.143.688

DE 612.432.018
1102



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
5310576501

RESPUESTA HIPOFISARIA DE FSH, LH, PRL,
TSH, HGH y CORTISOL A UN ESTÍMULO EN
HUMANOS PRE y POST PÚBERES

Tesis presentada para optar al
grado de Doctor en Medicina, por
la Licenciado Doña Sara-Leonor
MOLA PEREDA.

Madrid
-1977-

INDICE

	<u>Pág.</u>
<u>DEDICATORIA Y RECONOCIMIENTOS</u>	8
<u>INTRODUCCION</u>	11
<u>OBJETIVOS Y JUSTIFICACION</u>	19
<u>MATERIAL Y METODO</u>	22
I. <u>Material</u>	23
- Generalidades	
- Historia clínica	
- Exploración clínica	
- Tabla de Clasificación de los Grupos de sujetos masculinos estudiados	
- Tabla de Clasificación de los Grupos de sujetos femeninos estudiados	
- <u>Edad cronológica, ósea y peso/talla de los</u> 26 varones estudiados	
- <u>Edad cronológica, ósea y peso/talla de las</u> 22 hembras estudiadas	
II. <u>Sistemática de la Prueba</u>	33
a) Estímulos utilizados	
b) Método	
III. <u>Técnicas Analíticas</u>	35
- Generalidades	
IIIa) <u>Determinaciones hormonales por Radio-</u> <u>inmunoanálisis</u>	35
1. <u>Fundamentos del Radioinmunoanálisis</u>	35

- Componentes	
a) Anticuerpo específico antihormona	
b) Standard no radiactivo	
c) Sustrato marcado trazador	
d) Técnicas de separación de las fracciones libre y ligada	
2. <u>Condiciones del Ensayo</u>	42
- Tiempo de incubación	
- Temperatura	
- Volumen de incubación	
- Factores inespecíficos	
3. <u>Otros reactivos necesarios</u>	43
4. <u>Técnica del RIA</u>	44
- Tabla: Protocolo de Radioinmunoanálisis	
5. <u>Representación de la Curva Standard</u>	47
6. <u>Bases para evaluar la reproducibilidad del Radioinmunoanálisis</u>	48
- Precisión y su evaluación	
- Sensibilidad y su evaluación	
- Especificidad y su evaluación	
- Exactitud y su evaluación	
- Reproducibilidad y su evaluación	

7.	<u>Técnicas de la determinación de FSH, LH, PRL, TSH, GHG y Cortisol</u>	59
A.	<u>Radioinmunoanálisis de hormona foliculoestimulante (FSH)</u>	59
B.	<u>Radioinmunoanálisis de hormona luteinizante (LH)</u>	62
C.	<u>Radioinmunoanálisis de Prolactina (PRL)</u>	63
D.	<u>Radioinmunoanálisis de la hormona estimulante del tiroides (TSH)</u>	66
E.	<u>Radioinmunoanálisis de la hormona de crecimiento (GHG)</u>	70
F.	<u>Radioinmunoanálisis de Cortisol</u>	72
IIIb)	<u>Determinación de glucosa en sangre</u>	78
IIIc)	<u>Citodiagnóstico Hormonal:</u>	
	Colpocitograma y Urocitograma.....	79
	- Fundamentos.....	79
	- Imágenes citológicas de cada etapa sexual.....	83
	- Técnica de citología hormonal.....	87
	- Urocitograma.....	93
	- <u>Ejemplo de protocolo del Colpocitograma/ Urocitograma</u>	96
IV.	<u>Métodos Estadísticos</u>	97
IVa)	Parámetros o medidas dentro de un grupo	
IVb)	Comparación entre dos grupos de medias dependientes	
IVc)	Comparación entre medias independientes	

RESULTADOS.....	100
<u>A. RESULTADOS a partir del Primero y Segundo Análisis Estadístico.....</u>	102
I. <u>Concentraciones basales y efectos del estímulo sobre FSH</u>	103
Ia) Tabla I y Fig. 1: Resultados FSH en sexo masculino	
Ib) Tabla II y Fig. 2: Resultados FSH en sexo femenino	
II. <u>Concentraciones basales y efectos del estímulo sobre LH</u>	112
IIa) Tabla III y Fig. 3: Resultados LH en sexo masculino	
IIb) Tabla IV y Fig. 4: Resultados LH en sexo femenino	
III. <u>Concentraciones basales y efectos del estímulo sobre PRL</u>	120
IIIa) Tabla V y Fig. 5: Resultados PRL en sexo masculino	
IIIb) Tabla VI y Fig. 6: Resultados PRL en sexo femenino	
IV. <u>Concentraciones basales y efectos del estímulo sobre TSH</u>	129
IVa) Tabla VII y Fig. 7: Resultados TSH en sexo masculino	
IVb) Tabla VIII y Fig. 8: Resultados TSH en sexo femenino	
V. <u>Concentraciones basales y efectos del estímulo sobre GH</u>	138
Va) Tabla IX y Fig. 9: Resultados GH en sexo masculino	

Vb) Tabla X y Fig. 10: Resultados HGH en sexo femenino	
VI. <u>Concentraciones basales y efectos del estímulo sobre Cortisol</u>	145
VIa) Tabla XI y Fig. 11: Resultados de Cortisol en sexo masculino	
VIb) Tabla XII y Fig. 12: Resultados de Cortisol en sexo femenino	
VII. <u>Concentraciones basales y efectos del estímulo sobre Glucemia</u>	151
VIIa) Tabla XIII y Fig. 13: Resultados de Glucemia en sexo masculino	
VIIb) Tabla XIV y Fig. 14: Resultados de Glucemia en sexo femenino	
B. <u>RESULTADOS a partir del Tercer Análisis Estadístico</u>	156
I. <u>Estudio comparativo de FSH</u>	157
Ia) Grupos de Varones	
Ib) Grupos de Hembras	
Ic) Comparación entre Grupos de ambos sexos	
- Fig. 15: Comparación de los valores de FSH entre Grupos y sexos	158
II. <u>Estudio comparativo de LH</u>	160
IIa) Grupos de Varones	
IIb) Grupos de Hembras	
IIc) Comparación entre Grupos de ambos sexos	

- Fig. 16: Comparación de los valores de LH entre Grupos.....	161
- Fig. 17: Comparación de las respuestas de LH tras el estímulo en ambos sexos.....	162
III. <u>Estudio comparativo de PRL</u>	163
IIIa) Grupos de Varones	
IIIb) Grupos de Hembras	
IIIc) Comparación entre Grupos de ambos sexos	
- Fig. 18: Comparación de los valores de PRL entre Grupos y sexos	164
IV. <u>Estudio comparativo de TSH</u>	165
IVa) Grupos de Varones	
IVb) Grupos de Hembras	
IVc) Comparación entre Grupos de ambos sexos	
- Fig. 19: Comparación de los valores de TSH entre Grupos y sexos	166
V. <u>Estudio comparativo de GHG</u>	167
Va) Grupos de Varones	
Vb) Grupos de Hembras	
Vc) Comparación entre Grupos de ambos sexos	
- Fig. 20: Comparación de los valores de GHG entre Grupos y sexos	168
VI. <u>Estudio comparativo del Cortisol</u>	169
VIa) Grupos de Varones	

VIb) Grupos de Hembras	
VIc) Comparación entre Grupos de ambos sexos	
- Fig. 21 y Fig. 22: Comparación de los Valores de Cortisol en niños y niñas y comparación de los valores de Cortisol entre Grupos y sexos.....	170
VII. <u>Estudio comparativo de Glucemia</u>	171
VIIa) Grupos de Varones	
VIIb) Grupos de Hembras	
VIIf) Comparación entre Grupos de ambos sexos	
- Fig. 23: Comparación de los valores de Glucemia entre Grupos y sexos	172
<u>DISCUSION</u>	174
- Generalidades	
A. <u>Gonadotropinas (FSH y LH)</u>	175
B. <u>Prolactina (PRL)</u>	181
C. <u>Tirotropina (TSH)</u>	184
D. <u>Hormona de Crecimiento (HGH)</u>	184
E. <u>Cortisol</u>	186
<u>CONCLUSIONES</u>	188
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	194

DEDICATORIA

Y

RECONOCIMIENTOS

Dedico esta TESIS a mis compañeros del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Ambulatorio "Hnos. García Noblejas", de la Seguridad Social. He de mencionar en particular a los Doctores HERVAS, PEREZ MERIDA, REQUEJO, ORTIZ RIANCHO y CARRION, sin cuya cooperación incondicional no me hubiera sido posible realizarla. Pero que mencione primero estos nombres no significa olvido a la colaboración que me han prestado todos y cada uno de los demás compañeros del equipo, junto con las enfermeras y técnicos del laboratorio, los que de una forma u otra han contribuido a la realización de esta tarea.

Una mención especial va destinada al Profesor POZUELO ESCUDERO, quien con su ejecutoria al frente del Servicio y su plena entrega al ejercicio profesional constituye en todo instante el mejor ejemplo para quienes le rodeamos. Su capacidad creadora y entusiasmo incansable han ido unidos a una actitud de apoyo incondicional, que nunca olvidaré.

Al Profesor TAMARIT TORRES, mi gratitud eterna por su paciencia, dirección, eficacia y enseñanzas en las interminables mañanas de revisión de borradores en su Cátedra.

También quiero destacar la valiosa colaboración del Profesor PERALTA SERRANO, facilitándome el protocolo de un grupo de sus pacientes.

Y por último, y no por ello menos importante, quiero dar las gracias al Instituto Nacional de Previsión, a través de su Presidente del Consejo de Administración Doctor MARTINEZ ESTRADA, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo esta Tesis durante el desempeño de mi cargo de Médico Adjunto del Servicio.

El desarrollo de técnicas de bio y radioinmunoanálisis con suficiente sensibilidad para medir hormonas circulantes, ha hecho posible detectar concentraciones plasmáticas y urinarias de las hormonas procedentes del lóbulo anterior hipofisario, dentro de los niveles más bajos posibles. Las cifras basales de las hormonas gonadotropas, de la hormona de crecimiento, de la tirotropina, prolactina y corticotropina, han sido precisadas en sujetos de ambos sexos en diferentes edades de la vida, vislumbrándose la posibilidad de que a medida que se vayan perfeccionando y desarrollando nuevas técnicas de radioinmunoensayo, se podrán determinar otras hormonas menos conocidas, como son las hormonas alfa y beta melanocitoestimulantes y la lipotropina.

El descubrimiento de hormonas hipotalámicas, y su síntesis, permitiendo que cuando se les administra por vía exógena produzcan una rápida liberación de su hormona hipofisaria correspondiente y de otras almacenadas en las células del lóbulo anterior, ha demostrado que existe una reserva hipofisaria movilizable de las mismas, aún sin haber sido detectadas sus cifras basales. Por lo cual, en ciertas ocasiones y sobre todo en casos de deficiencias hormonales, resulta de mayor fiabilidad la práctica de una prueba de reserva hipo-

fisaria que la simple determinación basal hormonal. Las características de las respuestas en tiempo y magnitud de respuesta de cada una de las principales hormonas adenohipofisarias a la acción liberadora de su estímulo hipotalámico específico o de otros factores físicos, químicos o farmacológicos, han sido documentadas en estudios de individuos sanos y enfermos de ambos sexos, y en casi todas las edades de la vida.

El paralelismo entre los caracteres biológicos y químicos de dos o más hormonas adenohipofisarias --que ha permitido clasificarlas por familias-- relacionado con la embriogénesis común de sus células productoras, es probablemente la causa de que diferentes hormonas respondan al mismo estímulo. Esta pluralidad de acción es aceptada, aunque se siga manteniendo para la hormona hipotalámica liberadora su nombre de origen. Observaciones clínicas y experimentales muestran cómo la hormona hipotalámica liberadora de hormona luteinizante (LHRH) induce una rápida liberación de hormona luteinizante (LH) y de hormona folículo estimulante (FSH) por acción directa sobre las concentraciones hipofisarias de las mismas, y que la hormona hipotalámica liberadora de tirotropina (TRH) induce la respuesta de hormona tirotrópica (TSH) a nivel de la hipófisis, actuando directamente sobre la misma, e induce una respuesta aún mayor de prolactina (PRL), aunque no es, según Schally, la hormona liberadora específica de la misma, y sin estar controlada la PRL por mecanismos mediados por TRH. Las condicio-

nes de neuroglucopenia inducidas por la administración de insulina han sido ampliamente utilizadas para liberar hormona de crecimiento (GH), actuando por vía hipotalámica sobre el factor liberador de hormona de crecimiento (GH RH). Esta condición hipoglucémica, de stress, se ha comprobado produce también liberación de prolactina y de corticotropina (ACTH). Parece ser que los mecanismos de acción de la hipoglucemia inducida por insulina, estimulando la liberación de GH, PRL y ACTH, son indirectamente regulados a través del hipotálamo.

Se sabe además que esta pluralidad de respuesta de las hormonas del lóbulo anterior se ve mediatizada por estados de ansiedad o de enfermedad, por la acción de neurotransmisores centrales, por factores, como son el frío, el sueño, el ritmo circadiano, por acción hormonal como la de los esteroides gonadales, y por otros factores, ya probables, ya desconocidos.

Estas observaciones acerca de la pluralidad de acción hormonal son las que dieron lugar a que distintos grupos de investigadores desarrollaran pruebas funcionales integradas de liberación de todas las hormonas del lóbulo anterior, cada una con sus fundamentos y características, pero con el resultado común de ser pruebas de gran utilidad clínica por la necesidad frecuente de valorar la reserva hipofisaria, y por la reducción en el tiempo, esfuerzos y molestias para el paciente.

Rakoff y col. (1974) se basan en las observaciones de Mac Indor y Turkington, de que la liberación de GH y PRL, estimulada por la arginina, se lleva a cabo por vía hipotalámica. También parten de las acciones ya conocidas de LHRH sobre LH y FSH y de que TRH sobre TSH y PRL para desarrollar una prueba funcional integral de la adenohipófisis, de tal modo que administrando una infusión de arginina durante treinta minutos obtienen una rápida pero pequeña respuesta de PRL, seguida de la respuesta de GH, que consideran se producen por vía hipotalámica. Administrando a los noventa minutos un bolus conteniendo TRH y LHRH, obtienen otra respuesta de PRL mayor que la anterior, pero esta vez inducida por TRH. Obtienen además la esperada respuesta de TSH a TRH, más la inducida sobre las hormonas gonadotropas **por** LHRH. La primera mitad de la prueba daría la medida del estado hipotalámico, de acuerdo con la respuesta o no de la prolactina, y la segunda la medida de la integridad de la hipófisis, dada la respuesta de la prolactina directamente desde la hipófisis. Esta prueba, unida a los datos clínicos y de laboratorio, serviría para orientar si el defecto básico era una disfunción o una neoplasia de la hipófisis, o si era de origen hipotalámico y si había una o más hormonas involucradas en el proceso. La prueba en esta forma concebida, con una duración de seis horas, resultó de utilidad al aplicarse en casos patológicos, y muestra que las respuestas hormonales obtenidas en los grupos de control normales, eran similares, en magnitud y en tiempo de respuesta, a aquellas observadas cuando se

hacía la administración individual de cada una de las hormonas o factores liberadores específicos. Yen y col. (1972), además de Kastin y col., Jacobs y col., Bowers y col. y Rakoff y col., ya habían demostrado que tras la administración de LHRH y TRH en un solo bolus había un aumento concomitante de LH, FSH, PRL y TSH, y que las respuestas fueron similares a las observadas tras la administración aislada de LHRH ó TRH, tanto en tiempo como en amplitud.

Las dudas que pudieran surgir respecto a la posible interferencia ocasionada por la administración de los factores liberadores hipotalámicos, conjuntamente con otros factores de prueba de la función hipofisaria --o séase, la interacción en la secreción de una hormona por la concomitante liberación de otra-- son aclaradas por Mortimer y col. (1973), quienes demuestran que la administración simultánea de una hormona hipotalámica con otra y con insulina no modifica en ningún sentido la respuesta de las hormonas hipofisarias, concluyendo que esta prueba puede ser utilizada con ventajas ya que la integridad adenohipofisaria quedaría valorada en dos horas. Ellos determinan además cortisol por métodos fluorogénicos, como un índice de la secreción de ACTH, y recomiendan la utilidad clínica de la misma.

Además de estas dos comunicaciones se encuentran los trabajos de Voigt y col. (1975), quienes siguieron el método de Mortimer, pero modificándolo en el sentido de que utilizan arginina para producir la li-

beración de GH, y lisina-vasopresina para la inducción de la liberación de ACTH, arguyendo sobre la inconsistencia de la hipoglucemia inducida por insulina. Todas las hormonas, según estos autores, alcanzaron el mismo grado de respuesta que lo harían en una prueba de estimulación individual, encontrando la prueba de gran utilidad para valorar la reserva hipofisaria, sobre todo en pacientes de carácter ambulatorio.

Rastogi y cols. (1976), estudian esta prueba sometiendo a cinco hombres sanos a la estimulación simultánea intravenosa de insulina de TRH y de LHRH, repitiendo la misma con una semana de intervalo y a distintas horas del día (8, 12, 18 y 24 horas), con el objeto de estudiar el ritmo circadiano de las respuestas adenohipofisarias. Encuentran variaciones significativas en la glucemia, GH, cortisol y en cierta medida en PRL, pero no encuentran diferencias circadianas notables en las cifras plasmáticas de LH, FSH y TSH. Concluyen que las variaciones circadianas son evidentes cuando los estímulos actúan a través de mecanismos centrales o hipotalámicos y no cuando actúan estimulando directamente la adenohipófisis, en cuyo caso resultan idénticas las respuestas en los diferentes períodos estudiados. También sostienen que las variaciones circadianas observadas en respuestas donde los mecanismos centrales son operativos inducen a practicar la prueba con uniformidad en el tiempo, sobre todo en estudios de grupos.

Hervás y col. en este Servicio (en prensa), documentan esta prueba en

estudios de grupos controles adultos y de ambos sexos, y siguiendo la línea de Mortimer y col. , inducen hipoglucemia con insulina, e inyectan en el mismo bolus TRH y FSH, realizando siempre la prueba en horas de la mañana. Los resultados obtenidos constituyen el control de la prueba para su aplicación en adultos; pero no ha sido documentada en estudios de grupos controles infantiles.

Considerando sus ventajas ya mencionadas, en cuanto a rapidez de valoración hormonal, fiabilidad, reducción de molestias y tiempo para el paciente, que la revisten de gran utilidad en el niño, especialmente durante la época de crecimiento y desarrollo, se ha estudiado una muestra de niños y niñas en buen estado de salud física y mental, sin alteraciones en su proceso de desarrollo y crecimiento y en edades comprendidas entre 9.2 - 17.9 los niños y entre 7.2 - 15.2 las niñas, procedentes en su mayor parte del Servicio de Endocrinología de la Seguridad Social que dirige el Prof. Pozuelo Escudero, y procedentes también de los Servicios del Prof. Peralta, quien generosamente ha cedido los protocolos de algunos de sus pacientes para este estudio.

OBJETIVOS Y
JUSTIFICACION

En este trabajo se intentan establecer los valores normales de la respuesta de LH, FSH, PRL, TSH, GH y cortisol-- como índice este último de la reserva hipofisaria de ACTH-- tras la administración simultánea de los estímulos hipotalámicos sintéticos LHRH y TRH, más insulina, en un grupo de niños normales. Estos valores servirán, antes y después de la pubertad, de referencia para la aplicación de la prueba y sus respuestas en casos patológicos. A la vez, se pretende aprovechar la oportunidad para observar el comportamiento de hormonas que, como sucede principalmente con PRL, son objeto de estudios para aclarar su influencia en el desencadenamiento de la pubertad.

Los procesos metabólicos y glandulares propios del desarrollo y el crecimiento están bajo la influencia del eje neuroendocrino, y en consecuencia, las alteraciones relacionadas con los mismos requieren frecuentemente una valoración de la integridad adenohipofisaria.

Las alteraciones del crecimiento y desarrollo pueden ser causadas en esta época por excesos o defectos hormonales. En el primer caso se encuentra la pubertad precoz, cuando la maduración del esqueleto y sistema reproductivo se adelanta, retrasándose el crecimiento estatural-ponderal ante un exceso de producción de hormonas sexuales. En el segundo caso existe el hipogonadismo, con retraso en la madu-

ración del esqueleto y sistema reproductivo y adelanto en el crecimiento estatural-ponderal, con déficit en la producción de hormonas sexuales. Como que la etiología del trastorno puede estar localizada en cualquier nivel del eje neuroendocrino, se impone la valoración de la reserva hormonal de la hipófisis.

Sin llegar a los casos extremos antes mencionados, se encuentran situaciones intermedias, tales como los retrasos de talla y peso, denominados cronopatías por Marañón o adolescencia diferida por otros, en cuya etiología intervienen factores genéticos, constitucionales, nutricionales, ambientales, etc. En estos casos, el diagnóstico etiológico correcto es esencial y la valoración del estado hormonal de la hipófisis es importante para el tratamiento.

Además, deficiencias endocrinas primarias, apareciendo en forma simultánea o escalonada, pueden ser diagnosticadas como síndrome de hipofunción hipofisaria, y esta prueba vuelve a ser esencial. Y por último, el diagnóstico diferencial del origen hipotálamo-hipofisario de los trastornos justifica la aplicación de esta prueba de valoración.

MATERIAL Y MÉTODO

- I. Material
- II. Sistemática de la Prueba
- III. Técnicas Analíticas
- IV. Métodos Estadísticos

I. Material

Está recomendado que para establecer los valores hormonales de un grupo control, sobre todo en el caso de niños en época de desarrollo y crecimiento, se tengan en cuenta el peso, la talla, la edad sexual y la edad ósea en relación con la edad cronológica. El concepto de normalidad, sobre todo en esta época, depende de la relación armónica entre el desarrollo del esqueleto, la producción de hormonas gonadales, el desarrollo sexual y el crecimiento estatural y ponderal.

Teniendo en cuenta estos requisitos el material humano de este trabajo consistió en un grupo de niños de edades comprendidas entre 9.2 - 17.9 años, y otro grupo de niñas de edades comprendidas entre 7.2 - 15.2.

Seleccionados los sujetos en principio, de acuerdo con su edad cronológica, se estableció un protocolo en el que se incluyó: Historia clínica, exploración clínica y exploraciones complementarias.

Historia clínica: Se tuvieron en cuenta los siguientes apartados:

- Antecedentes familiares
- Antecedentes personales
 prenatales
 nacimiento

crecimiento y evolución durante la primera y
segunda infancia
enfermedades padecidas
traumatismos, intervenciones quirúrgicas e
intoxicaciones
factores ambientales y sociales
nivel intelectual

- Anamnesis por aparatos

órganos de los sentidos
sistema nervioso
aparato digestivo
aparato respiratorio
aparato circulatorio
aparato genitourinario
sistema locomotor

Exploración clínica:

talla, peso, perímetro cefálico y torácico

relación pubis-suelo, diámetros bitro-
cantéreo y biacromial

coloración de piel y mucosas

distribución de la grasa

cabeza: conformación cefálica y fascies, ojos, garganta, nariz, oídos; Boca: lengua, orofaringe, paladar y encías.

cuello: adenopatías, exploración de tiroides

tórax: inspección, auscultación cardíaca y pulmonar

• abdomen: inspección, palpación y percusión

exploración del aparato genital masculino:

tamaño de los testículos

distribución del vello sexual

tamaño del pene

vello púbico, abdomen, tórax, axilas y barba

exploración del aparato genital femenino:

conformación de la vulva

inspección: conformación labios mayores y

menores, clítoris, introito vaginal, himen

exploración mamaria

vello púbico y axilar

Exploraciones complementarias:

radiografía de carpo y mano izquierda

citología vaginal en las niñas

Las determinaciones de hormonas sexuales no estuvieron incluidas en este trabajo. Está bien establecido por Job y cols. (1974) y otros la correlación entre el ascenso de las cifras circulantes de testosterona en niños y de estrógenos en niñas a medida que transcurren los fenómenos que conducen a la pubertad. Sin embargo, como entre los criterios de maduración de Tanner se encuentra el correspondiente al

grado de maduración sexual en las niñas, se ha realizado esta valoración por medio de técnicas de citología hormonal o de urocitograma.

Las tablas que se usaron para comparar talla en altura y peso con edad cronológica de los niños fueron las publicadas por J.R. GEIGY, SA. en Documenta Geigy, Tablas Científicas (6ª edición).

La radiografía de mano izquierda sirvió para determinar la edad ósea por comparación de la misma con los esquemas radiológicos del Atlas de Greulich & Pyle (1974), y siguiendo los criterios establecidos por estos autores se consideraron como normales aquellos sujetos cuya edad ósea se ajustaba a estos esquemas, sin apartarse de los mismos en más de dos desviaciones standard.

A los sujetos que pasaron el examen clínico y cuyo grado de crecimiento y desarrollo sexual fue considerado como normal por la relación armónica entre su peso y talla, edad ósea, edad sexual con su edad cronológica, se les hizo una exploración genital mas detallada con el objeto de clasificarlos en grupos, siguiendo los índices establecidos por Marshall y Tanner (1969), aunque con ciertas modificaciones. Estos autores clasifican los sujetos de acuerdo con el avance de sus caracteres sexuales secundarios, en cinco grupos. En el primero, que denominan P1, incluyen niños que aún no muestran signos de pubertad. En el segundo P2, aquellos con pubertad incipiente. Luego hacen una división en grupos P3 y P4, de los chicos y chicas con signos mas avan-

zados de pubertad, pero de acuerdo con el grado de avance de la misma. El grupo P5 de estos autores está constituido por muchachas con menarquia establecida y varones con signos de desarrollo testicular completo.

Debido a que la muestra obtenida después de hacer la selección de los sujetos, no era lo suficientemente amplia para poder hacer una clasificación exactamente igual a la anterior, se modificó la misma en el sentido de incluir en un grupo que se siguió denominando P1, a los niños sin signos de pubertad externa. En el grupo P2 se integraron los que mostraron sus primeros signos de desarrollo sexual. En un grupo que se denominó P3P4, se englobó a los que tenían un grado avanzado de desarrollo sexual, sin llegar a la menarquia en las hembras, y observándose en los varones que no habían completado aún su desarrollo totalmente. En el grupo P5, se incluyeron estos últimos. La clasificación quedó como se detalla en la Tabla siguiente, dividida por sexos.

Grupo	EDAD	n(*)	VARONES	
			CRITERIOS DE NORMALIDAD:	
			maduración	10-18 años (\bar{X} 13)
			primeros signos pubertad	10-15 " (\bar{X} 12)
			brote crecimiento	10-16 " (\bar{X} 14)
			desarrollo completo	14-18 " (\bar{X} 13)
			Marshall y Tanner (1970)	
P1	9,2-12,2	6	- no hay signos clínicos de pubertad - testículos 1, 2, 3 ml.	
F2	12-13	6	- aumento tamaño testículos más de 3 ml y/o - aparición de vello pubiano	
P3-P4	12-15,3	7	- pene comienza a aumentar de tamaño - mayor aumento tamaño de testículos - vello pubiano más abundante ----- - pene aumentado más de tamaño - testes más de 12 ml - vellos abundantes se extiende abdomen, tórax, axilas, vello fino en labio superior y mentón	
P5	14,5-17,9	7	- cesan de crecer testículos (normales entre 12-25 ml) - vello abundante, barba	

(*) n = Número de sujetos

Grupo	EDAD	n(*)	HEMBRAS
			CRITERIOS DE NORMALIDAD:
			maduración 8-16 años (\bar{X} 13) primeros signos pubertad 8-13 " (\bar{X} 11) brote crecimiento 10-14 " (\bar{X} 12) menarquia 11-15 " (\bar{X} 13) Marshall y Tanner (1969)
P1	7, 2-11, 3	5	<ul style="list-style-type: none"> - no hay signos clínicos de pubertad - mucosa vaginal o sedimento urinario: predominan células cianófilas profundas e intermedias (atrofia vaginal)
P2	10, 5-12, 11	5	<ul style="list-style-type: none"> - botón mamario y/o algunos vellos grandes labios - aumento tamaño labios mayores y menores - mucosa vaginal o sedimento urinario: aparecen células eosinófilas superficiales aumentan intermedias disminuyen profundas: (hipotrofia vaginal)
P3-P4	12-13, 8	6	<ul style="list-style-type: none"> - mayor aumento mamas: se palpa tejido glandular se ven folículos Montgomery - vello púbico se extiende monte de Venus - aparece vello axilar - engrosamiento labios mayores y menores <li style="text-align: center;">---- - la areola forma mamelón secundario sobre mama aumentada de tamaño - se extiende el vello púbico lateralmente - vello en axila moderado - genitales externos bien desarrollados - mucosa vaginal o sedimento urinario células eosinófilas y cianófilas superficiales aumenta, disminuyen intermedias, nulas o algunas células profundas (buen trofismo vaginal)
F5	13, 5-15, 2	6	<ul style="list-style-type: none"> - menstruaciones regulares - mucosa vaginal o sedimento urinario = que P3P4 avanzado, con cambios cíclicos entre una y otra menstruación

(*) n = Número de sujetos

Para valorar el estado de desarrollo y crecimiento de un niño no basta con comparar su peso y talla en función de su edad cronológica con otros grupos de niños de igual edad y sexo, pero con características genéticas raciales y nutricionales distintas, a partir de las cuales se confeccionan las tablas generalmente usadas para ello, siendo lo ideal establecer los propios grupos controles para tener patrones propios de referencias. Además, teniéndose en cuenta que la rápida maduración sexual que caracteriza la pubertad se acompaña de aumento en la velocidad del crecimiento anual --el estirón de la adolescencia-- y la aparición de la pubertad varía entre unos y otros niños, con un margen de varios años, puede suceder que al establecer comparaciones, unos estén sexualmente más adelantados o retrasados que otros, teniendo la misma edad cronológica, creándose dudas acerca de su normalidad.

Por otra parte se ve que en esta época la maduración sexual y el crecimiento ponderal y estatural son paralelos. En las niñas, un año antes de la menarquia se produce el máximo aumento de la talla, y cuando los órganos reproductores han adquirido la maduración completa necesaria para que aparezcan las menstruaciones, la velocidad de crecimiento disminuye y se producen cambios en el esqueleto que conducen al cierre o fusión de los cartílagos epifisarios.

En niños sucede lo mismo: junto a la aparición de los caracteres sexuales secundarios, o séase, vello púbico o axilar y aumento de los testículos, se produce un máximo incremento estatural anual, que disminuye a continuación y termina con el cierre de las epífisis, una vez que la maduración sexual se ha completado.

Los estudios comparativos del esqueleto en grupos de individuos, a través de su infancia y adolescencia, comprueban que entre la maduración sexual y la del esqueleto hay una relación más estrecha que entre la primera y el aumento de peso y talla. Al desarrollarse progresivamente el esqueleto se producen en el mismo cambios que son visibles en las placas radiográficas y que se suceden en forma progresiva y ordenada, lo cual permite establecer comparaciones entre los sujetos, sin tener en cuenta los factores nutricionales, regionales y genéticos que influyen en la talla y el peso siempre que no haya habido enfermedades que alteren el progreso normal del mismo.

Las tablas radiológicas de Greulich y Pyle han sistematizado los signos propios de la maduración del esqueleto para cada etapa de la vida, y siguiendo sus pautas se puede calcular el índice de maduración sexual de un sujeto relacionado con su edad ósea y de acuerdo con los modelos del Atlas.

Siguiendo estos criterios en este estudio del protocolo general de cada sujeto se han separado los datos correspondientes a su EC (edad cro-

nológica), EO (edad ósea) y Peso/Talla (en kilogramos y centímetros, respectivamente), para mostrar las características de cada niño/niña en particular, dentro de cada uno de los grupos separados.

Intentar en 48 sujetos la ilustración detallada sobre su estado de maduración sexual y otros datos de su exploración física y analítica haría demasiado extensa la exposición. Por ello, en las Tablas que se reproducen a continuación, sólo se recogen los datos aludidos anteriormente.

G. P1 (Masculino) edades entre 9, 2-12, 2 n : 6		G. P3-P4 (Masculino) edades entre 12-15, 3 n : 8					
Nombre	EC	EO	PESO/TALLA	Nombre	EC	EO	PESO/TALLA
1. J.R.R.	9,2	11	38 /140,5	1. C.B	12	11,6-12,6	33,3/146
2. M.G.A	9,5	9-10	34,5/125,5	2. V.PE	12,6	12,6-13	51,2/145,6
3. S.F	10,9	11-11,6	39,1/141,5	3. J.MV	12,8	12,6-13	52 /154
4. C.C.	11,1	11,6	43 /137	4. SASG	13,1	12,6-13	55,8/158
5. MA.	11	10-11	37,9/146	5. MC	13,4	13	50,6/147,6
6. J.T.	12,2	11	53,1/155	6. E.N	14,1	-	62 /168,2
				7. A.M	14,8	12,6-13	45,3/152,1
				8. MA.GF	15,3	15	63,3/157,2
G. P2 (Masculino) edades entre 10, 9-13 n : 6		G. F5 (Masculino) edades entre 15-17, 9 n : 6					
Nombre	EC	EO	PESO/TALLA	Nombre	EC	EO	PESO/TALLA
1. F. MS	12	11,6-12	35,5/143,3	1. V.S	14,5	13,6	42,3/155
2. J. LM	12,2	10,5-11	43 /145,2	2. A.S	14,5	13	49,2/148
3. JAS.G	13	12,6-13	55 /148,6	3. MAGF	15	14-15,6	64,5/159,4
4. M.A.	12,10	12	32,5/138	4. RMG	17	17	67 /170,7
5. M.E	13	12,6-13	52,3/150,5	5. JMV	17,5	16-17	56,8/159
6. S. MD	12,6	12,6-13	47,4/149,6	6. M.	17,9	17-18	53 /165,9

<u>G. F1 (Femenino)</u> edades entre 7,2-11,3 n: 5		<u>G. P3-P4 (Femenino)</u> edades entre 12-13 n: 6					
Nombre	EC	EO	PESO/TALLA	Nombre	EC	EO	PESO/TALLA
1. GM	7,2	7,6	22/123,5	1. AB	12	10,9-11,2	53,5/160
2. TM	7,3	8,0-9,0	24/129,7	2. MFG	12,4	11 -12	52,3/148
3. EC	8	8,0	27,5/120	3. MTG	12,10	13	54 /159,1
4. MCG	8,9	8,8-9,0	32,2/138	4. MLUS	13	12 -13	46 /155
5. MBA	11,3	10,0-11,0	35 /137	5. SCH	13,8	12 -13	60,5/165
				6. SRS	13,8	-	70,5/161

<u>G. P2 (Femenino)</u> edades entre 10,5-12,11 n: 5		<u>G. P5 (Femenino)</u> edades entre 13,5-15,2 n: 6					
Nombre	EC	EO	PESO/TALLA	Nombre	EC	EO	PESO/TALLA
1. SRS	10,5	8,9-9,6	39,7/137,2	1. GB	13,5	12-13	47 /153
2. EL	11,3	11,0	29,8/137,1	2. FLA	14	14	44,2/145,2
3. DM	11,6	11,0	33,5/147,9	3. CSG	15,1	15	40 /149,5
4. E.V.CB	12,11	10,5-11,0	44 /145	4. AMG	15,5	14-15	44 /164
5. C.VB	11	10,5-11,5	40 /135,2	5. ATR	15	15	45 /165,5
				6. LGG	15,2	15	61 /158

II. Sistemática de la prueba

a. Los estímulos hipotalámicos sintéticos utilizados en la prueba en estudio y sus propiedades farmacológicas son los siguientes:

--- LHRH: decapeptido sintético, con las mismas propiedades físico-químicas del compuesto natural aislado por Schally cols. (1967) en extractos hipotalámicos de cerdo, con actividad liberadora de las hormonas luteinizante y estimulante del folículo, LH y FSH, a nivel de la hipófisis en adultos (Schally y cols. 1971), induciendo en niños prepuberales la liberación de la reserva hipofisaria normal de ambas (Schally y cols. 1971).

--- TRH: tripéptido sintético, sintetizado y usado desde 1970 en humanos con fines diagnósticos (y algunos usos terapéuticos, como antidepresivo), con las mismas propiedades de la hormona hipotalámica, aislada por Schally (1969) en hipotálamo de ovejas, capaz de producir la liberación de TSH, tanto en adultos como en niños, y con acción de carácter específico. No produce alteraciones significativas en las concentraciones séricas de ACTH, HGH, LH ni cortisol, pero tiene actividad liberadora de prolactina aunque TRH no es la hormona hipotalámica liberadora de PRL la cual (Schally, 1976, 1977) tiene su propio factor liberador.

--- INSULINA: La propiedad de la insulina para provocar el aumento de las cifras bajas circulantes de HGH en niños y adultos fue demostrada por Roth y cols. (1963), dando lugar al aumento de la misma a los 20-40 minutos de inyectada por vía intravenosa.

Además, está demostrado el efecto hipoglucemiante de la insulina para producir aumentos de cortisol circulante, por acción del mismo sobre la concentración de ACTH hipofisaria a través de la vía hipotálamica, produciendo su liberación, vía por medio de la cual la hipoglucemia insulínica provoca también la liberación de PRL.

- b. Los estudios fueron iniciados entre las 8 y 9 de la mañana. Los pacientes acudieron al laboratorio en ayunas y se les puso en posición decúbito supino en una camilla. Una cánula Butterfly fue insertada en una vena antecubital, la que se mantuvo permeabilizada por medio de una infusión salina fisiológica, gota a gota. Después de tomar 10 cc de sangre para las determinaciones basales se comenzó a administrar en forma secuencial: Insulina regular, a razón de 0.1 U/Kg de peso, TRH sintético (300 µg) y LHRH sintético (100 µg). Las muestras se obtuvieron a los 20, 40, 60, 80 y 100 minutos. Centrifugadas estas muestras, los sueros se extrajeron y separaron en fracciones de 0.5 cc para cada hormona determinable por RIA, y 0.1 cc para la glucosa. Excepto la glucemia, que se determinó el mismo día, los demás sueros se refrigeraron a -20°C hasta el momento de hacer las determinaciones hormonales.

III. Técnicas Analíticas

Generalidades: Las técnicas analíticas son las siguientes:

- Determinaciones hormonales por radioinmunoanálisis: Radioinmunoanálisis de FSH, LH, PRL, TSH, HGH y Cortisol.
- Determinación de Glucemia
- Determinación del índice estrogénico en pacientes del sexo femenino, por medio del colpocitograma y del urocitograma.

Las determinaciones séricas de FSH, LH, PRL, TSH, HGH y Cortisol se hicieron por medio de técnicas de radioinmunoanálisis, la determinación de los valores de la glucosa en suero, por medio del método de la Orto-toluidina, y la determinación del índice estrogénico en las niñas, mediante técnicas citológicas, vaginales o urinarias, según la edad.

IIIa) Determinaciones hormonales por Radioinmunoanálisis

1. - Fundamentos del Radioinmunoanálisis.

El RIA entra dentro de las técnicas conocidas como análisis de saturación que en general se basan en hacer reaccionar la sustancia a determinar (F) con un receptor específico (Q) de capacidad limitada; la sustancia P se repartirá en dos fracciones, una unida a Q y la otra libre,

dependiendo de la cantidad de P presente. Esta fracción libre podrá determinarse comparando su distribución y la obtenida por una serie de estándares o cantidades conocidas de P, introducidas en el sistema.

El modo más generalizado de identificar las dos fracciones ligada y libre de la substancia P, es añadir una pequeña cantidad de material radioactivo, generalmente idéntico a P, en el sistema. Al separarlos por un método físico-químico adecuado, la distribución de la radiactividad da idea a su vez de la distribución de la substancia P, a medir.

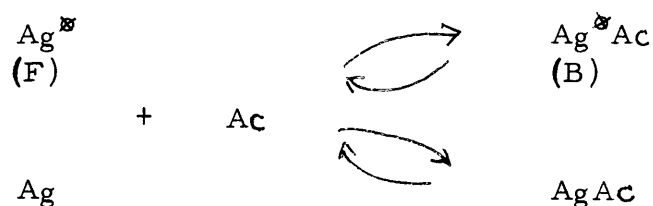
El análisis por saturación se conoce también como análisis competitivo o por desplazamiento, que hace mención a la competencia entre los ligandos marcado y frío (no marcado) o al desplazamiento de uno de ellos por el otro, respectivamente, en la reacción con el receptor.

Cuando el receptor es un anticuerpo la técnica recibe entonces el nombre de radioinmunoanálisis, término que se debe a Ekins (1971) quien junto con Yallow y Berson (1960) son los primeros en poner en práctica estos métodos.

Se ha demostrado que las hormonas polipeptídicas pueden actuar como antígenos (Berson y cols., 1955, 1956 y otros). Y las hormonas que no son peptidos también pueden actuar como antígenos unidas a una proteína. Si se inyectan en organismos extraños a ellas y en condiciones favorables, inducen la producción de anticuerpos contra sí mismas, de

forma que se puede obtener del organismo inyectado un suero que contiene el anticuerpo específico contra esa hormona que a su vez sirve para conseguir una reacción antígeno-cuerpo cuando el suero conteniendo el anticuerpo se une a la hormona que lo produjo, en un tubo de ensayo. Si se marca el antígeno (la hormona) con un isótopo radioactivo (I^{125} , I^{131} , C^{14} , etc) el antisuero reacciona con ella de igual forma que si no estuviera marcada. El radioinmunoanálisis pues, aprovecha la propiedad de la hormona no marcada del plasma o de otras soluciones, para competir con la hormona marcada en su reacción con el anticuerpo específico y, por lo tanto, de evitar la formación del complejo Ag - Ac marcado.

El principio de inhibición competitiva del RIA, se basa en las siguientes reacciones:



en donde: Ag^* es el antígeno marcado

Ag es el antígeno no marcado

$\text{Ag}^* \text{Ac}$ es el complejo marcado antígeno-anticuerpo

AgAc es el complejo no marcado antígeno-anticuerpo

Ac es el anticuerpo específico

Cuando la $|AC|$ es pequeña respecto a la $|Ag^*|$ (trazador), limitando de este modo su capacidad de unión al mismo, las moléculas no marcadas del antígeno competirán por los centros específicos del anticuerpo, alterando así la distribución de la radiactividad, o lo que es lo mismo el cociente B/F . Se podrá, así, construir una curva estandar comparando concentraciones conocidas de antígeno no marcado con el valor de B/F o de cualquier otro parámetro de distribución (F/B , % B , etc), obtenido para cada concentración.

De modo que en un sistema de RIA, resultan esenciales cuatro componentes:

- Anticuerpo específico antihormona (substancia ligadora específica)
- Standard no radiactivo (hormona sin marcar o fría)
- Sustrato marcado o trazador (una hormona marcada con un isótopo radiactivo)
- Técnicas de separación de las fracciones libre y ligada, o séase de separación del antígeno libre marcado (hormona marcada) y el que se ha ligado al antisuero en forma de complejo $Ag^* - Ac$.

Al final de la incubación la radiactividad que interesa medir es la del antígeno marcado ligado al anticuerpo.

a: Anticuerpo específico antihormona: En RIA la sustancia ligadora es un anticuerpo que reacciona con la sustancia a detectar, de esa interacción depende la especificidad del análisis. Por tanto debe reunir las siguientes características:

- 1) Fácil disponibilidad y coste adecuado: Los kits comerciales han permitido el uso de anticuerpos comercializados a coste razonable por muestra analizada.
- 2) Título adecuado: entendiéndose por tal la concentración óptima del anticuerpo o bien la dilución final del antisuero usado en el análisis y depende de factores tales como: peso molecular y composición del antígeno usado, tiempo de inmunización, dosis total del inmunógeno, forma de administración del antígeno, relación entre las especies (del antígeno y del animal inmunizado).
- 3) Especificidad: capacidad de discriminación de un antígeno diferente frente a otras sustancias presentes en el análisis.
- 4) Adecuada afinidad o avidéz del anticuerpo por el antígeno.

b: Standard no radiactivo: En técnicas de RIA, es responsabilidad del ensayista la elección de las preparaciones de referencia (cuando no existen estándares internacionales ni patrones de referencia) de acuerdo con los siguientes criterios: similaridad: relación constante entre

el rango de concentración elegido entre la curva standard y diluciones seriadas del suero conteniendo la substancia problema; estabilidad para mantenerse cogelados a -20°C ; disponibilidad durante largo período de tiempo: ya que los nuevos estándares deben ser calibrados frente a uno primitivo; y homogeneidad entre la especie de que procede y la especie de la substancia problema, si es posible.

c: Sustrato marcado trazador: El trazador aunque puede prepararse en el laboratorio también puede obtenerse de las casas comerciales. Debe poseer alto grado de pureza química y radioquímica y haberse conseguido a una alta actividad específica. Para especies no peptídicas el radionucleótido empleado en la obtención del trazado se incorpora por medios biosintéticos generalmente (H-3-Cortisol , I-125-tiroxina , etc.). Para los peptídicos el radioisótopo es incorporado al sustrato por técnicas de marcaje adecuadas, por las cuales se consigue que por un determinado proceso químico quede unido a la especie de interés formando el sustrato marcado.

El tipo de radionucleótido utilizado y los métodos de preparación del sustrato influyen en la actividad específica y pureza del análisis. El uso casi generalizado en la actualidad de I-125 substituye al que se usó en primer lugar (I-131) para el marcaje de insulina y resulta con mejores garantías en cuanto a pureza y actividad específica del sustrato marcado.

En la elección del nucleótido ha de considerarse que la mayoría de los compuestos que se someten a técnicas de RIA están constituidos por elementos de isótopos radiactivos emisores de partículas beta (C-14 y H-3). El uso de radionucleótidos beta emisores presenta inconvenientes (por actividad específica baja dado sus grandes períodos de semidesintegración y otros motivos).

Los gamma emisores disponibles y adecuados para ser utilizados en la obtención de trazadores, no son, salvo excepciones, pertenecientes a los elementos que constituyen los compuestos de interés biológico (hormonas polipeptídicas, esteroides, drogas, vitaminas), por lo cual, al sustituir a átomos de la sustancia a ensayar modificarán su estructura. Presentan, sin embargo, ventajas que los hacen deseables frente a los beta emisores.

De los gamma emisores, el I-131 y el I-125 dan resultados satisfactorios al usarlos en el marcaje de hormonas polipeptídicas. El I-131 ha quedado actualmente sustituido casi en su totalidad por el I-125 cuyas características más importantes son: período de semi-desintegración adecuado, gran abundancia isotópica, eficiencia alta al ser determinado por las técnicas de centelleo con cristal de NaI y ausencia total de emisión beta.

d: Técnicas de separación de las fracciones, libre y ligada: Consiste en métodos cuantitativos y rápidos para separar las fracciones ligada

de modo que la radiactividad de cualquiera de las partes pueda medirse con la máxima exactitud posible. Los métodos que se han utilizado son: separación cromatoelectroforética; técnicas basadas en la precipitación de las fracciones libres y ligadas (absorción de la fracción libre por un carbón activado es la más empleada) y la técnica de separación empleando un doble anticuerpo que es la más útil dada su alta especificidad y adaptabilidad a cualquier sistema de RIA.

2. - Condiciones del Ensayo

La técnica en RIA está sometida a ciertos principios, como son:

-- Tiempo de incubación. Tanto en el un sistema de RIA, como en otros en los cuales se utiliza una sustancia ligadora diferente a un anticuerpo, la velocidad de formación del complejo es mayor que la de desociación, o sea que teóricamente el equilibrio entre los componentes del sistema (inicialmente disociador) debería establecerse en un intervalo de tiempo corto. Esto no ocurre con interacciones tipo polipéptido-anticuerpo, que precisan tiempos más prolongados. Y se aumenta la sensibilidad del ensayo incubando en no-equilibrio unos días, al cabo de los cuales se añade el trazador manteniéndose la incubación un tiempo igual o mayor a $2/3$ de la primera fase. Los kits comerciales indican tiempos de incubación para cada ensayo.

-- Temperatura. Difiere según el sistema.

-- Volumen de incubación. Cuanto mayor el volumen de incubación se obtiene mayor precisión técnica (pipeteo). El volumen depende del método de separación empleado.

-- Factores inespecíficos. Se deben a altas concentraciones de suero o plasma introducidos en el ensayo, cuando éste no es lo suficientemente sensible para determinar concentraciones desconocidas.

3. - Otros reactivos necesarios

Soluciones tampón (fosfato, borato, veronal, etc.) con molaridades bajas (0,05-0,1 M) con el fin de mantener un pH constante entre 7,4 y 8,6 aproximadamente, ya que si varía se puede desnaturalizar la hormona y además si se acidifica, se retarda e inhibe la reacción antígeno-anticuerpo

En los búffer mencionados suelen añadirse quelantes tipo E.D.T.A. (etilén-diamino-tetraacético) con el fin de evitar que los iones Ca^{++} p. ej., produzcan precipitaciones inespecíficas del complejo y de la hormona libre.

También se añaden proteínas como la albúmina bovina, albúmina humana, suero de caballo, etc. al 1 - 2%, con el fin de igualar la concentración protéica en todos los tubos y además impedir que la hormona se pegue a las paredes.

4. - Técnica del RIA

1º Hay que preparar un protocolo que servirá de guía de las cantidades de reactivos que se añadirán a los tubos correspondientes y para identificar los problemas y los standard. (ver protocolo).

2º Se prepara el búffer

3º Se prepara el antisuero antihormona a la dilución conveniente.

4º Se preparan las diluciones de los standard partiendo de una que tenga una concentración

n ng / ml. o μ U / ml. (Standard 1º).

1 ml + 1 ml de búffer (" 2º) = n/2 ng/ ml

1 ml + 1 ml de búffer (" 3º) = n/4 ng/ ml

1 ml + 1 ml de búffer (" 4º) = n/8 ng/ ml

1 ml + 1 ml de búffer (" 5º) = n/16 ng/ml

5º Los problemas se preparan de acuerdo con la concentración de hormona que se espera contengan. Si entran dentro de las concentraciones de la curva standard, se ponen sin diluir. Si no, se diluyen a 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 etc.

6º El protocolo consta de los siguientes grupos de tubos:

PROTOCOLO RADIOINMUNOANALISIS

	tubo n°	Antisuero	Buffer	Standard	Problemas	Hormona marcada	Separac. 2º Anticuerpo
A) Ceros	1-2-3	0.1	0.2	-	-	0.1	0.1
B) Standard	4-5-6	0.1	0.1	n - 0.1	-	0.1	0.1
	7-8-9	"	"	n/2 "	-	"	"
	10-11-12	"	"	n/4 "	-	"	"
	13-14-15	"	"	n/8 "	-	"	"
	16-17-18	"	"	n/16 "	-	"	"
C) Problemas	19-20-21	0.1	0.1	-	0.1	0.1	0.1
	... 92-93-94	"	"	-	S.D. 1/3 1/32	"	"
D) Control centrifug.o filtración	95-96-97	-	0.3	-	-	0.1	0.1
E) Control radiactividad total	98-99-100	-	0.3	-	-	0.1	0.1

S.D. = Sin Diluir

- a) "ceros, que no llevan hormona fría y sí marcada
- b) "Standard", que llevan hormona fría en concentración creciente.
- c) "problemas", que lleva los plasmas a dosificar.
- d) "control de centrifugación o filtración", que dará la radiactividad inespecífica que se pega a las paredes del tubo o que queda en el filtro.
- e) "control de radiactividad total", que da la radiactividad total que ponemos en forma de hormona marcada (unas 8-10.000 c. p. m.)

Cada punto debe ponerse por triplicado o por lo menos en duplicado.

Una vez pipeteadas las cantidades descritas en el protocolo se realiza la incubación durante 3-4 días a 0°C. Hay algunas hormonas cuya incubación se realiza en estufa a 37°C durante 1 día, como la hormona de crecimiento.

Al final de la incubación se efectúa la separación del complejo $Ag^* - Ac$ por alguna de las técnicas descritas anteriormente y se cuenta la radiactividad durante uno o dos minutos.

5. - Representación de la curva Standard.

Una vez obtenidos los datos se procesan de forma que podemos representar los siguientes tipos de curva standard:

1º En ordenadas % de radiactividad ligada por los ceros y standard respecto a la radiactividad total, y en abscisas la concentración de hormona standard puesta a reaccionar.

2º En ordenadas % de radiactividad ligada por los standard con respecto a los "ceros", considerando que lo que ligan es el 100%. Así se obtienen los llamados cocientes $\frac{C}{C_0} \times 100$ ó RFB (Relative Percent Binding). En abscisas la concentración de hormona standard.

3º En ordenadas los mismos porcentajes vistos anteriormente, y en abscisas el logaritmo decimal de la concentración de hormona standard puesta a reaccionar

4º En ordenadas el logit = $\ln \frac{B - B_1}{B_0 - B_1}$ y en

$$1 - \frac{B - B_1}{B_0 - B_1}$$

abscisas el logaritmo decimal de la concentración de hormona standard.

\ln = log. neperiano; B = radiactividad de los standard y problemas.

B₁ = radiactividad de los controles de centrifugación o filtración.

B₀ = radiactividad ligada por los ceros.

5º En ordenadas los cocientes B / F y en abscisas la concentración de hormona standard. (B = radiactividad ligada en forma de complejo $Ag^* - Ac$. F = radiactividad de la hormona libre). En abscisas la concentración de hormona standard.

Una vez representado el tipo de curva que convenga se podrá extrapolar el $z\%$ de cada problema dentro de la misma y así conocer la concentración de hormona que tiene. Estos cálculos se facilitan si se realizan con una calculadora programada. Se ha utilizado la Olivetti P-602.

6. - Bases para evaluar la reproducibilidad del radioinmunoanálisis.

El radioinmunoanálisis mide concentraciones de hormonas; debido a ello se necesitan unos principios para poder analizar y comparar los distintos métodos. Se han descrito muchos análisis "específicos", con su "precisión", "sensibilidad" y "exactitud". Sin embargo, estos términos pueden prestarse a confusión por su uso inadecuado, por lo que debe establecerse el sentido en que aquí se emplean (Midgley y cols. 1.969).

Partiendo de la base de que lo que sucede en el radioinmunoanálisis es una reacción antígeno-anticuerpo entre los sitios de unión anticuerpo y la hormona, ya sea fría o marcada, y que el análisis depende de la separación de la hormona marcada libre de la que se ha ligado al anticuerpo en forma de complejo $Ag^* - Ac$, es necesario, para facilitar

ésta y las siguientes discusiones usar los términos siguientes:

S = Standard

U = Problema

T* = Hormona marcada total añadida a cada tubo expresada en c.p.m.

B* = Hormona marcada ligada al anticuerpo, expresada en c.p.m.

F* = Hormona marcada no ligada al anticuerpo, o libre, en c.p.m.

Así: $T^* = B^* + F^*$

Ht = Cantidad de hormona no marcada, o fría, añadida al tubo.

B_0^* = Cantidad de hormona marcada, ligada al anticuerpo en ausencia de Ht o "ceros".

$Y = \frac{B^* - B_1}{B_0^* - B_1}$ (B1 = radiactividad del control de centrifugación o filtración).

X = Log. Ht.

ΔY = Incremento en Y.

ΔX = Incremento en X como consecuencia de Y,

X_s = Log_e de la cantidad de standard en cada tubo.

X_u = Log_e de la cantidad de problema en cada tubo.

$$\text{Logit. (Y)} = \log_e \frac{Y}{1 - Y} = \log_e \frac{\frac{B^* - B1}{B_0^* - B1}}{1 - \frac{B^* - B1}{B_0^* - B1}}$$

Con una cantidad constante de anticuerpo y de hormona marcada, el aumento (Ht) (Standard) se relaciona inversamente con los cocientes

$$\frac{B^*}{F^*}.$$

Las bases para evaluar la reproducibilidad del radioinmunoanálisis son; precisión, sensibilidad, exactitud y especificidad.

Precisión y su evaluación. - Midgley (1969) la ha definido como la concordancia de una serie de medidas de una muestra con la media de dicha serie. Puede calcularse mediante el parámetro (Coeficiente de precisión) definido como el cociente entre la desviación standard (D.S.) de la respuesta (R) y la pendiente de la curva R frente a dosis, para cada dosis. La precisión es independiente de K.

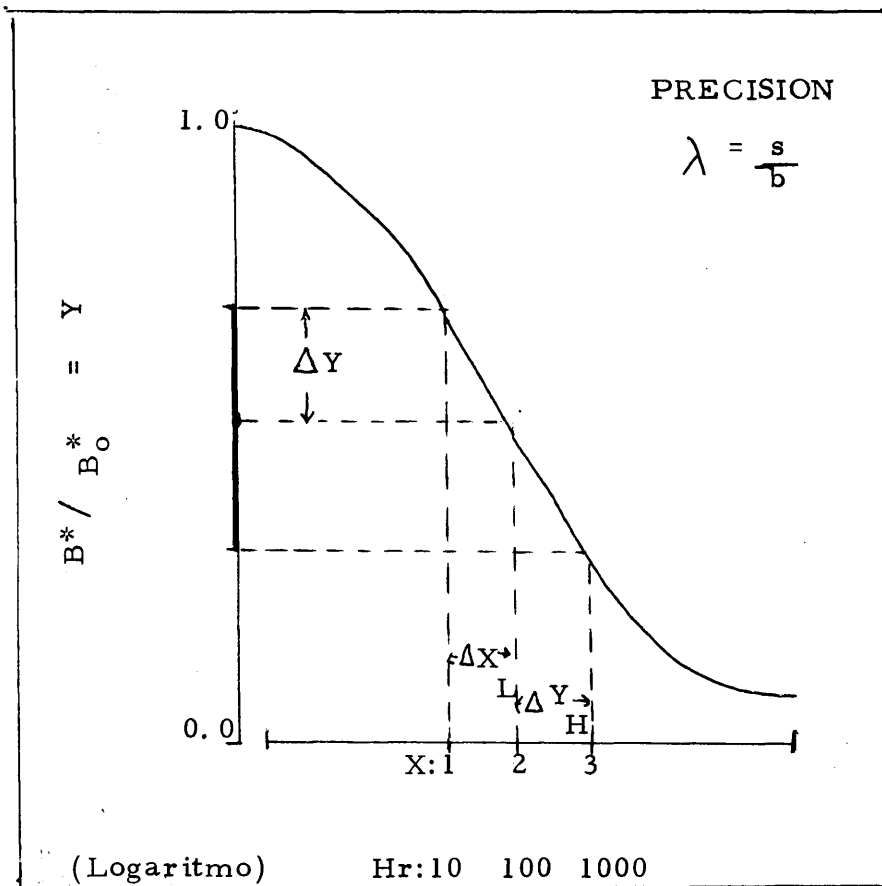


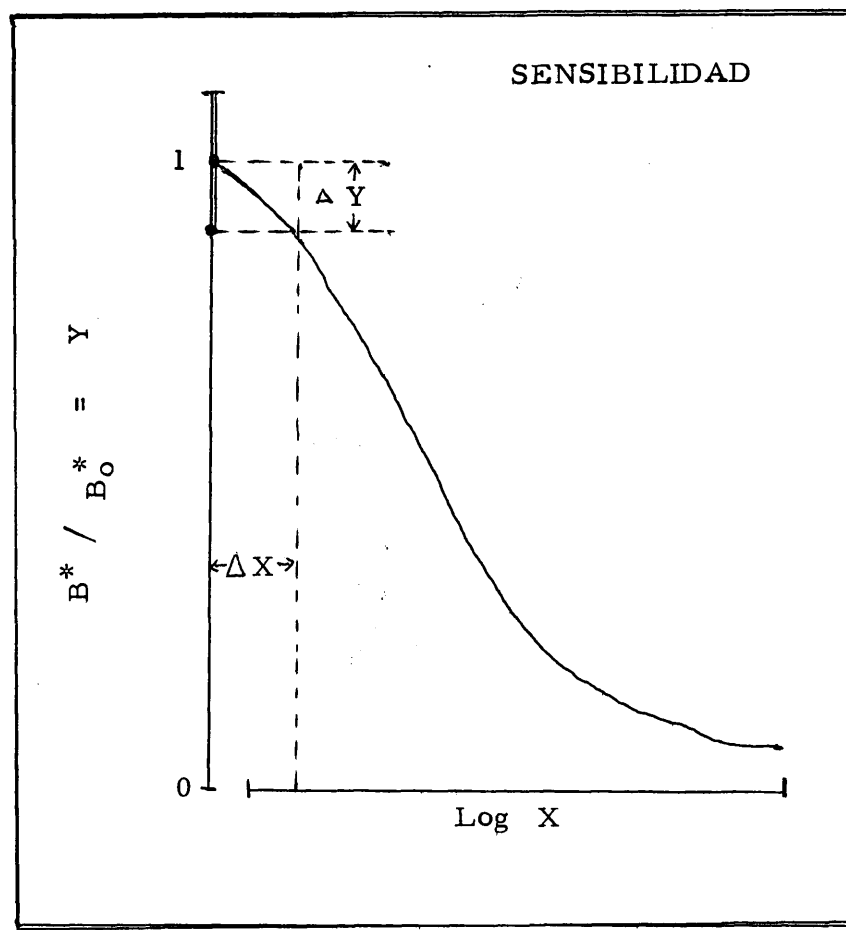
Ilustración de la precisión, representada por el índice que depende de la varianza (s) y de la pendiente (b). Se llama la atención sobre el hecho de que a una variación pequeña de Y , no le corresponde una proporción de X .

La medida de una muestra será más precisa cuanto menos haya entre los resultados de las diferentes medidas, de aquí que la precisión se puede definir como la diferencia entre las distintas medidas de una misma muestra y la media de esas medidas. Si el error en X depende del

error en Logit (Y), la varianza (s), dividida por la pendiente (b) nos proporciona un índice de precisión $\lambda = \frac{s}{b}$. En la figura se ilustra la precisión. Se define como el efecto de la pendiente de la curva y del error en la estimación de Y , Y , sobre la determinación de X en un valor particular de Y . Aunque Y es igual a ambos lados de Y , X_L no es igual a X_H cuando Y es igual a $0'5$. De aquí que hay que establecer límites de confianza en una curva dada.

Los menores detalles técnicos pueden afectar la precisión significativamente. Así sucede según el método de micropipeteo que se utilice. Igual ocurre, si antes de centrifugar para separar el complejo $Ag^* - Ac$ de la hormona libre, se añade búffer frío a todos los tubos, pues se diluye la hormona libre marcada (F^*) y se disminuye el error.

Sensibilidad y su evaluación. - La sensibilidad queda definida como la menor cantidad de hormona no marcada X que puede ser distinguida de $H_t = 0$ (Midgley, 1.969). Es decir, la mínima cantidad de hormona fría que al competir con la hormona marcada produzca un desplazamiento que sea significativamente distinto del que se produce cuando sólo hay hormona marcada frente al antisuero. Definida así, la sensibilidad depende del error en la determinación de Y , según la siguiente figura.



Cuando $Y = 1$, y la pendiente de la curva en este punto. La cantidad exacta dependerá del error elegido por el investigador. Se usan los límites de confianza del 95%, o sea, un error del 5% para los B_0^* (ceros). Un procedimiento mejor sería el examen de la distribución del error total en el radioinmunoensayo, y determinar la relación entre Y y su varianza. (Y), para $Y = 1$. Con esta definición se puede comparar fácilmente la sensibilidad entre varios ensayos diferentes.

Especificidad y su evaluación. - Se define la especificidad como el grado de libertad de interferencia por otras sustancias, con la que se intenta.

medir (Midgley 1.969). Esta interferencia puede deberse a:

a: Reacciones cruzadas inmunológicas. Una sustancia inmunoreactiva se define como aquella sustancia capaz de reaccionar con los sitios de unión del anticuerpo. Ya que existe heterogeneidad entre sustancias inmunoreactivas en los sitios de unión del anticuerpo, no es sorprendente que diferentes anticuerpos puedan combinarse con la misma sustancia inmunoreactiva, con diferentes energías de reacción, de acuerdo con su K. Inversamente, los mismos sitios del anticuerpo pueden combinarse con diferentes sustancias inmunoreactivas y con diferentes valores de K. Estas consideraciones que son particularmente importantes con grandes y complicadas moléculas, tales como las hormonas glicoprotéicas, significan que ningún antisuero tendrá propiedades idénticas a ningún otro.

Además, implican que las reacciones cruzadas serán la regla, más que la excepción, ya que en unos pocos sitios de unión del antisuero, es verosímil que tengan una débil asociación para sitios inmunoreactivos de alguna otra molécula. Si hay pocas diferencias en las constantes de asociación, se obtienen curvas que son esencialmente paralelas y casi superponibles. Sin embargo, si dos hormonas tienen grupos diferentes de sitios inmunoreactivos, unos comunes y otros diferentes, se obtienen curvas asimétricas o de inhibición bifásica.

b: Fresencia de sustancias marcadas inespecíficas. Un radioinmunoanálisis específico supone la presencia de una única especie molecular de hormona marcada. Si hay una segunda, no es posible la especificidad, ya que el antisuero puede reaccionar con estos compuestos no deseados. Como los anticuerpos se obtienen usualmente contra preparaciones que son más puras que aquellas que son marcadas, es lógico que los anticuerpos que haya presentes contra estas sustancias inespecíficas, sea muy alto. La presencia de dos o más sustancias marcadas, implica la existencia de dos o más sistemas inmunoreactivos por separado. Estudiando curvas de inhibición obtenidas con cantidades variables de hormona purificada, más otros compuestos que puedan existir como contaminantes, se pueden obtener curvas bifásicas, a menudo con una meseta pronunciada.

c: Diferencias en la composición del medio de incubación. Un radioinmunoanálisis específico supone constante la composición físico-química en el medio de incubación de todos los tubos; o que las diferencias que puedan existir, no interfieran con la reacción inmunológica. Se sabe que cambios en la composición iónica, fuerza iónica, pH, temperatura, concentración proteica, urea, etc., pueden influenciar la reacción, la estabilidad de la hormona marcada y fría, la adsorción de hormona al vidrio, etc. En un intento para mantener constante el medio, se suele añadir suero libre de hormonas, de forma que todos los tubos tengan igual cantidad de suero, sueros que contienen hormonas sin reac-

ción cruzada con el antisuero, sueros que están libres de hormonas después de pasarles por resinas de intercambio iónica; sueros almacenados durante mucho tiempo con hormonas sin reactividad ó sueros que han sido tratados anteriormente con anticuerpos contra la hormona en cuestión.

Una de las mejores formas para determinar el efecto de variación en la composición del medio de incubación es el test de recuperación que puede hacerse demostrando primero, que una preparación hormonal da curvas que son paralelas a la curva standard cuando se disuelve en el mismo medio de incubación. Se puede añadir la hormona a diferentes medios de incubación y hacer diluciones. Si la variación en el medio de incubación no tiene efecto, el análisis de la regresión lineal de la cantidad prefijada, sobre la cantidad medida en la curva standard, dará una pendiente de 1 y la intercepta en 0.

Exactitud y su evaluación. - La exactitud se define como el grado en que la media de un número infinito de medidas de una substancia, está de acuerdo con la cantidad exacta de la substancia que está presente (Midgley 1.969). Así, la evaluación de la exactitud, requiere una definición ambigua de la substancia que se mide. Ya que decir que la substancia que se mide es una hormona, es insuficiente: Las hormonas son substancias segregadas a la sangre, que actúan y producen sus efectos. Una hormona puede tener más de una actividad biológica; se

puede sintetizar de una forma, almacenar de otra, circular de otra y ser excretada como un metabolito. El suero puede tener productos metabólicos rotos, derivados, sub-unidades, agregados moleculares y moléculas parcialmente sintetizadas. Como que cada una de estas formas puede tener diferentes cantidades de actividad biológica, la actividad biológica neta representa una suma de las actividades asociadas de las distintas formas de la hormona que están presentes en una muestra. Así, la potencia estimada por bioensayo, no se puede correlacionar siempre con las concentraciones molares de las distintas formas de la hormona presentes en toda la muestra. Si el bioensayo no puede ser siempre el punto de referencia para comparar con el radioinmunoanálisis, hay que saber cuál será este punto de referencia.

Si aún suponiendo que el medio de incubación es constante, asegurarían que tanto la hormona marcada, como la standard, tienen la misma energía de reacción con el anticuerpo, no es completamente exacto ya que el standard, a menudo, se prepara a partir de extractos hipofisarios, mientras que las muestras problema, son muestras de suero, con lo que la posibilidad para que haya diferencias en las constantes de asociación/disociación, es muy alta. Por esta razón, sería ventajoso emplear como standard, materiales similares a los del suero. Así, el análisis de extractos crudos de hipófisis serán relativamente más exactos, cuando se use un extracto crudo de hipófisis como standard.

Lo mismo se puede decir para muestras de suero, pudiéndose usar una mezcla de sueros que contengan una concentración muy alta de hormona.

Otro método para evaluar la exactitud relativa es comparar resultados obtenidos con radioinmunoensayos diferentes. Si los antisueros son capaces de discriminar diferencias sutiles, el acuerdo entre los resultados para un gran número de preparaciones diferentes por dos o más radioinmunoanálisis específicos sugiere evidentemente que se está dosificando la misma substancia.

Reproducibilidad y su evaluación. - La reproducibilidad se define como el grado en que una medida es semejante a otra medida repetida (Midgley 1. 969). La evaluación de la reproducibilidad es una evaluación de la estabilidad y similitud de las condiciones elementales:

- a) Dentro de un análisis.
- b) Entre análisis realizados por un solo analista.
- c) Entre análisis realizados por distintos analistas.
- d) Entre laboratorios.

7. - Técnicas de las determinaciones de FSH, LH, PRL, TSH, HGH y Cortisol utilizadas en este trabajo y basadas en los fundamentos expuestos.

A. Radioinmunoanálisis de hormona foliculoestimulante (FSH). Se utiliza el "Kit" proporcionado por la casa "Serono", con el cual el complejo antígeno-anticuerpo radiactivo es precipitado químicamente con la adición de una solución de glicopolietileno que al final de la incubación se recoge por centrifugación.

Reactivos

- a) búffer para la solución tampón
- b) antisuero anti-FSH
- c) FSH standard liofilizada
- d) HCG marcada con I-125
- e) segundo anticuerpo
- f) solución de glicopolietileno

Preparación de los reactivos

Si se preparan con antelación a la prueba se mantienen en congelación a -20°C si es por más de 2 días, a 4°C si es por uno o dos días. El búffer se disuelve con 120 ml de agua bidestilada y se agita. El anti-suero anti-LH con 12.4 de la solución búffer y se agita. El standard de FSH se disuelve con 10 ml de la solución búffer y se divide en partes alícuotas de 2 ml. Una de estas fracciones, que representa el primer punto de la curva standard (50mU/ml) se tomará en cada análisis para preparar, a partir de la misma, 5 diluciones seriadas en proporción 1:2, con la solución búffer, para obtener los distintos puntos de la curva standard. La HCG marcada con I-125 se disuelve con 12,5 ml del búffer. El segundo anticuerpo con 12.5 ml de la solución búffer y se mezcla suavemente. La solución de glicopolietileno viene ya preparada para su uso.

Procedimiento

Se plantea el protocolo con cuatro grupos de tubos:

- 4 tubos blanco (concentración de la hormona, cero)
- 2 tubos control (sin adición de anti-suero)
- tubos standard (por duplicado para cada punto de la curva)
- tubos problemas (por duplicado)

Se diluye cada muestra con la solución búffer en la proporción 1:2 y se

pipetean dentro de los correspondientes tubos, a continuación se pipetean los standards : tomando una parte alícuota de 2 ml (50 mU/3ml) se pone 0.1 por triplicado en los tubos correspondientes: 1er. standard. De este se toma 1 ml y se le añade 1 ml del búffer para obtener el 2º standard, (25 mU/ml) que también se pone en los tubos por triplicado y así sucesivamente hasta obtener el 6º standard (1.6 mU /ml).

El procedimiento del análisis es el siguiente:

reactivos	standard	problema	blanco	control
suero problema 1:2	-	0.1	-	-
FSH standard	0.1	-	-	-
búffer	-	-	0.1	0.2
anti -FSH	0.1	0.1	0.1	-
Se mezcla e incuba a temperatura ambiente durante 6 horas				
HCG marcada I-125	0.1	0.1	0.1	0.1
Se mezcla e incuba a temperatura ambiente durante 20 horas.				
Segundo anticuerpo	0.1	0.1	0.1	0.1
Solución glicopolietileno	1.0	1.0	1.0	1.0

Se mezcla con agitador vibratorio. Se centrifuga a razón de 3,500-4,000 r.p.m. durante 2 o 3 minutos. Se decanta el sobrenadante y se mide la radiactividad del precipitado en los tubos, con contador gamma.

Se mide la radiactividad de los tubos blanco, standard y problemas.

Los controles de radiactividad se separan para medirlos al final.

Cálculo de resultados.

Se halla la curva standard en papel logarítmico colocando el resultado de los c. p. m. de cada punto standard frente a la concentración de la hormona correspondiente. A continuación interpolando en la gráfica obtenida el promedio de los c. m. p. obtenidos para cada problema, se tienen las correspondientes concentraciones de la hormona, las cuales se multiplican por 2 (factor de dilución) para obtener así la correcta concentración del problema.

La referencia de este "kit" es: mUI-FSH del 2º IRF-HCG =35 ng de LER 907.

Utillaje.

micropipetas automáticas 0.1 ml tipo "Oxford"

tubos de plástico desechables (10x70 mm aproximadamente)

agitador rotatorio

contador gamma de pozo automático

B. Radioinmunoanálisis de hormona lúteo estimulante (LH). Se utiliza el "kit" facilitado por la casa "Serono", en el cual el complejo antígeno-anticuerpo es precipitado por la adición de una solución de glicopolietileno, igual que en la técnica de radioinmunoanálisis para la hormona luteinizante.

Reactivos

- a) búffer para la solución tampón
- b) antisuero-anti LH
- c) LH standard liofilizada
- d) HCG marcada con I-125
- e) segundo anticuerpo
- f) solución de glicopolietileno

La preparación de los reactivos, el procedimiento del análisis, el cálculo de los resultados y el utillaje, son los mismos que los descritos para la técnica de la hormona foliculoestimulante, por lo que para evitar repeticiones sólo se añade que la referencia de este método es 1 mUI/LH del 2nd. IRP-H.M.G. = 5 ng LER 907.

C. Radioinmunoanálisis de prolactina (PRL). Se utiliza el "kit" proporcionado por la casa "Serono" en el cual el método de precipitar el complejo antígeno-anticuerpo es añadiendo suero antigammaglobulina al final de la incubación es recogido por centrifugación.

Reactivos

- a) búffer para la solución tampón
- b) suero anti-PRL
- c) preparación standard de PRL

- d) PRL marcada con I-125
- e) suero anti RGammaglobulina

Preparación de los reactivos

Se disuelve el búffer con 120 ml de agua destilada. El suero anti-PRL se disuelve con 12,5 ml del búffer, La preparación de PRL standard se disuelve en 10 ml de la solución búffer y se divide en porciones alícuotas de 2 ml. A partir de cada parte alícuota que representa en primer punto de la curva (100 ng/ml) se preparan seis series de soluciones con una proporción de 1:2 añadiendo la solución búffer, con el objeto de preparar los distintos standards que servirán de referencia para los distintos puntos de la curva. El vial que contiene la hormona marcada con I-125 se disuelve con 12,5 ml de la solución búffer. El antisuero RGammaglobulina se disuelve con 12,5 ml del búffer.

Procedimiento

Se plantea el protocolo con cuatro grupos de tubos:

- 4 tubos para el blanco (no se añade hormona fría)
- 4 tubos para control (no se añade antisuero)
- 2 tubos para cada nivel standard
- 2 tubos para cada muestra de suero

Las muestras de suero que proceden de sujetos normales o en los que se sospechan moderados niveles de prolactina se emolean sin diluir,

pero si se sospechan altas concentraciones de PRL como en los casos de los últimos meses del embarazo o de tumores hipofisarios se diluyen en proporción 1:2 con la solución búffer.

Se preparan los standards en seis series de soluciones con una proporción de 1:2 como se ha descrito anteriormente

El procedimiento del análisis es el siguiente:

reactivos	standard	muestra	blanco	control
muestra	-	0.1	-	-
standard de PRL	0.1	-	-	-
búffer	-	-	0.1	0.2
suero anti-PRL	0.1	0.1	0.1	-
PRL marcada I-125	0.1	0.1	0.1	0.1
(se mezcla e incuba a temperatura ambiente 20-24 horas)				
suero anti-RGG	0.1	0.1	0.1	0.1
(se mezcla e incuba a temperatura ambiente por 20-24 horas)				

Al final de esta incubación la total radiactividad de los tubos "blanco" se cuenta. Se recoge luego el precipitado por centrifugación.

Centrifugación: Se añaden 2 ml de agua destilada a cada tubo, para diluir la hormona "libre" marcada. Se centrifugan los tubos a 3.500 - 4.000 xg durante 30'. Se decanta el sobrenadante y los tubos se dejan boca abajo en una hoja de papel de filtro. Se cuenta la radiactividad

precipitada en los tubos control. Se presenta el substractor del Contador gamma con la media c.p.m. precipitada en los tubos control. Se cuentan todos los tubos: los "blanco", standards y problemas por 1 minuto.

Cálculo de resultados

La media c.p.m. en los tubos "blanco" se usa para calcular el porcentaje de enlace en ausencia de la hormona marcada, después se calcula el porcentaje de inhibición para cada standard y muestra problema.

La curva standard se dibuja comparando el % de inhibición con las diferentes concentraciones standards. Se usa papel de semilogaritmos en los que los niveles standard se marcan en la abscisa y los % de inhibición se marcan en las ordenadas.

Interpolando en la gráfica de la curva standard el porcentaje relativo de la muestra no diluida se obtiene la concentración correspondiente (en ng/ml) de hormona. Si se diluyeron antes, se multiplican por el factor de dilución.

Utillaje. Es igual que en las técnicas anteriores.

D. Radioinmunoanálisis de la hormona estimulante del tiroides (TSH)

Se utiliza el "kit" de CEA-IRE-SORIN, compuesto de los siguientes:

Reactivos

- a) TSH marcada con I 125
- b) TSH standard liofilizada
- c) Antisuero anti-TSH
- d) Inmunoabsorbente
- e) Tween 20
- f) Tampón veronal 0'02 M a pH 8'4

Preparación de los reactivos

Todos se preparan en el momento que van a ser utilizados: el tampón se disuelve con 200 ml de agua bidestilada y 0.1 ml de tween 20 verificando el pH que debe quedar entre 8.2 - 8.6. La TSH marcada biofilizada se disuelve con 10 ml del tampón, la TSH standard con 5 ml del tampón y el antisuero con 10 ml del tampón.

Si se sospecha alto contenido hormonal en las muestras de plasma éste se diluye con el tampón. Se preparan las diluciones standards, a partir de la solución madre (16 ng/ml) obteniéndose standards de 0.5-1-2-4-8 y 16 ng/ml de acuerdo con el siguiente proceso:

1 ml de la solución madre en tampón veronal standard St 6 (16 ng/ml)
0.5 ml del standard St 6+0.5 ml del tampón (standard St 5). 0.5 ml del standard St 5+0.5 ml de tampón (standard St 4). 0.5 del standard St 4+0.5 ml de tampón (standard St 3). 0.5 ml standard St 3+0.5 ml

de tampón, búffer (standard St 2). 0.5 ml standard St 2+0.5 ml del tampón (standard St 1). (0.5 ng/ml).

Procedimiento del análisis

Se prepara el protocolo y los grupos de tubos:

Grupo T para determinación de la actividad total

Grupo 0 para el punto cero de la curva y la determinación de la habilidad de enlace.

Grupos standard del 1-6 para 6 puntos de la curva standard por triplicado

Grupos Sx para las muestras problemas.

Se distribuyen los reactivos siguiendo el siguiente orden:

Grupos de Tubos	Búffer ml	Standard ml	TSH I-125	Antisuero ml
Grupo T	-	-	0.1	-
Grupo 0	0.3	-	0.1	0.1
Grupo St 1 a St 6	0.2	0.1	0.1	0.1
Grupos Sx	0.2	0.1	0.1	0.1

Pipeteados todos los tubos, se mezcla el contenido con un agitador

Vortex se incuba a temperatura ambiente 18-24 h.

Separación de TSH ligada y TSH marcada

1. - Se añade el inmuno absorbente manteniendo la suspensión obtenida

al añadir 10 ml del tampón, mediante agitador Vortex mientras se pipetea 0.5 ml en cada tubo (excepto en el grupo de tubos T).

Se tapan los tubos y se incuban agitando durante 3 horas en un agitador magnético.

2. - Lavado y conteo del precipitado. Se centrifugan los tubos 3.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se aspira el sobrenadante con una trompa de vacío. Se diluyen 75 ml del tampón con 225 ml de agua bidestilada y se pipetea 3 ml del mismo dentro de todos los tubos. Se mezcla suavemente el contenido. Se centrifuga a 3.000 r.p.m. por 5 minutos. Se decanta el supernadante por medio de trompa al vacío.

3. - Un segundo lavado con 3 ml de agua destilada. Se mezcla el contenido, se decanta o centrifuga. Se aspira el supernadante por trompa al vacío.

Cálculo de resultados

Se mide la radiactividad de todos los tubos empezando por el grupo T. Se cuenta la r.a. durante 1-2 minutos según la cuenta obtenida en los tubos de reactividad total. Se representa la curva standard y se interpolan los valores obtenidos expresados en porcentajes, en función de la cantidad de TSH de cada patrón. Se multiplican por diez los valores obtenidos y se halla así la concentración de los sueros problemas en ng/ml.

Utilaje

pipetas automáticas con puntas desechables

tubos de polietileno

mezclador tipo Vortex

centrífuga

contador gamma automático

E. Radioinmunoanálisis de la hormona de crecimiento (HGH). Se utiliza el "kit" que suministra la casa CEA-IRE-SORIN, en el cual se emplea el método de doble anticuerpo para separar el complejo antígeno-anticuerpo. El doble anticuerpo es obtenido inyectando a conejos, inmunoglobulinas de cobayas.

Reactivos

- a) antisuero anti-HGH liofilizado.
- b) HGH marcada con I-125
- c) HGH standard, liofilizada
- d) segundo anticuerpo
- e) búffer borato 0.13 M + E.D.T.A. + BSA 0.1% a pH6
- f) albúmina humana al 5%

Preparación de los reactivos

Al vial conteniendo el antisuero anti-HGH liofilizado se le añaden 10

ml de agua bidestilada, dilución capaz de ligar el 40-60% de la radiactividad de la hormona marcada. Se obtiene de cobayas. El vial conteniendo la hormona HGH marcada con I 125 se disuelve con 10 ml de agua bidestilada de forma que en cada tubo se ponen a reaccionar 0.1 ng/ml con una actividad de 10-12.000 c.p.m. aproximadamente. El HGH standard liofilizado se disuelve 2 ml de agua bidestilada y se hacen diluciones seriadas para hacer la curva standard con las concentraciones de 0.1 - 0.25 - 0.5 - L y 2 ng/0.1 ml. La seroalbúmina humana se disuelve con 10 ml de agua bidestilada, y el búffer borato con 10 ml de agua bidestilada.

Procedimiento

Se plantea un protocolo con cinco grupos de tubos: blancos, controles, standards y problemas. Se pipetea 0.1 ml por triplicado de cada uno de los puntos. En los ceros se añade 0.1 ml del búffer borato. Se mezclan los contenidos de los viales de seroalbúmina humana y de antisuero anti-HGH. De la mezcla se pipetean 0.2 ml en los tubos ceros, standards y problemas. A los controles de centrifugación y de radiactividad total se les pone 0.2 ml del búffer borato. Se agitan en mezclador tipo Vortex todos los tubos, poniéndoles luego a incubar en estufa, a 37°C durante 6 horas.

A las 6 horas se añade 0.1 ml de HGH marcada con I-125 a todos los tubos y después de nueva agitación en el Vortex se colocan en estufa

a 37°C durante 18 horas.

Al cabo de este tiempo se añade el segundo anticuerpo: 0.1 ml en todos los tubos menos en los controles. Se agita nuevamente y se incuba durante 1 hora en estufa a 37°C. Se añade el búffer borato y se centrifuga durante 40 minutos a 2.500 r. p. m. Se decanta el sobrenadante y se cuenta la radiactividad entre 2-5 minutos.

Cálculo de resultados

Se representa la curva standard obteniendo mediante interpolación de resultados los valores problemas.

Utillaje

micropipetas automáticas tipo Oxford

tubos de polietileno

mezclador tipo Vortex

contador automático de centelleo gamma

centrífuga

F. Radioinmunoanálisis de cortisol. Se utiliza el "kit" comercial "Cortipac". Los fundamentos del método son los descritos para el radioinmunoanálisis, pero en este caso el anticuerpo que se utiliza es la transcortina o proteína transportadora del cortisol. Se aprovecha la competencia entre el cortisol marcado que se introduce en el sistema, con

el cortisol en cantidades desconocidas contenido en los problemas. Los resultados del método son semejantes, según han comprobado Gore y Lester (1975), a los resultados que se obtienen de medir el cortisol en suero o plasma por métodos fluorimétricos.

Reactivos

a) cortisol standard en suero humano liofilizado, en cuatro concentraciones diferentes a saber 2.3 $\mu\text{g/ml}$, 5.9 $\mu\text{g/ml}$, 17.0 $\mu\text{g/ml}$, y 43 $\mu\text{g/ml}$ para confeccionar la curva de control standard.

b) tubos conteniendo: - no más de 0.2 μc de cortisol marcado con selenio 75 como sustrato radiactivo.
- gránulos absorbentes en suspensión en un medio búffer.
- transcortina unida al cortisol marcado.

Además, el "kit" suministra una hoja-protocolo conteniendo tres recuadros: un primer recuadro para anotar el conteo obtenido a partir de los tubos conteniendo cada una de las concentraciones de suero standard; otro recuadro para anotar el conteo obtenido a partir de los sueros problemas; y una gráfica semilogarítmica con cuatro puntos de referencia correspondientes a las distintas concentraciones de los sueros standards y en las que se trazará la curva standard. Sobre ésta se superpondrán los resultados de los sueros problemas y así se determinará el conteo.

nido de cortisol en los mismos.

Preparación de los reactivos

Se reconstruye el suero standard añadiendo a cada vial 0.5 ml de agua destilada, se deja en reposo 5 minutos para que se disuelva.

Procedimiento

Se plantea el protocolo y se preparan los grupos de tubos.

Se extrae, por medio de pipetas automáticas 0.1 ml del suero problema y se coloca en su tubo correspondiente por duplicado.

Se extrae 0.1 ml de cada frasco de suero standard y se introduce en su correspondiente tubo, por triplicado.

Se añade a cada tubo 0.2 ml de agua destilada.

Se agitan en el agitador rotatorio.

Se calientan en baño de agua a 70°C, durante 10 minutos.

Se enfrían a la temperatura ambiente.

Se mezclan en el agitador rotatorio.

Se pipetea 0.2 ml de cada tubo, problemas y standards, dentro de los viales que contienen el cortisol marcado, el búffer y la transcorina.

Se vuelven a mezclar, a temperatura ambiente, durante 30 minutos en el agitador rotatorio.

Luego se invierten los tubos para arrastrar y lavar los gránulos y a

continuación se dejan reposar por 5 minutos para permitir el sedimentación de los gránulos en el fondo del tubo.

Por último, se extrae con pipeta --sin mover los gránulos del fondo-- el sobrenadante, que se coloca en tubos de conteo para material radiactivo.

El primer conteo que se hace es el del selenium 75 en el sobrenadante. Se hace el conteo de las muestras y los resultados obtenidos en el conteo se llevan a las gráficas para resultados. Para los standards se anota el resultado del conteo en los ejes Y, y de las concentraciones de cortisol se hace sobre los ejes logarítmicos X. Se construyen las curvas sobre estos puntos y se buscan los resultados en la abscisa de la gráfica.

Utillaje

tubos de conteo

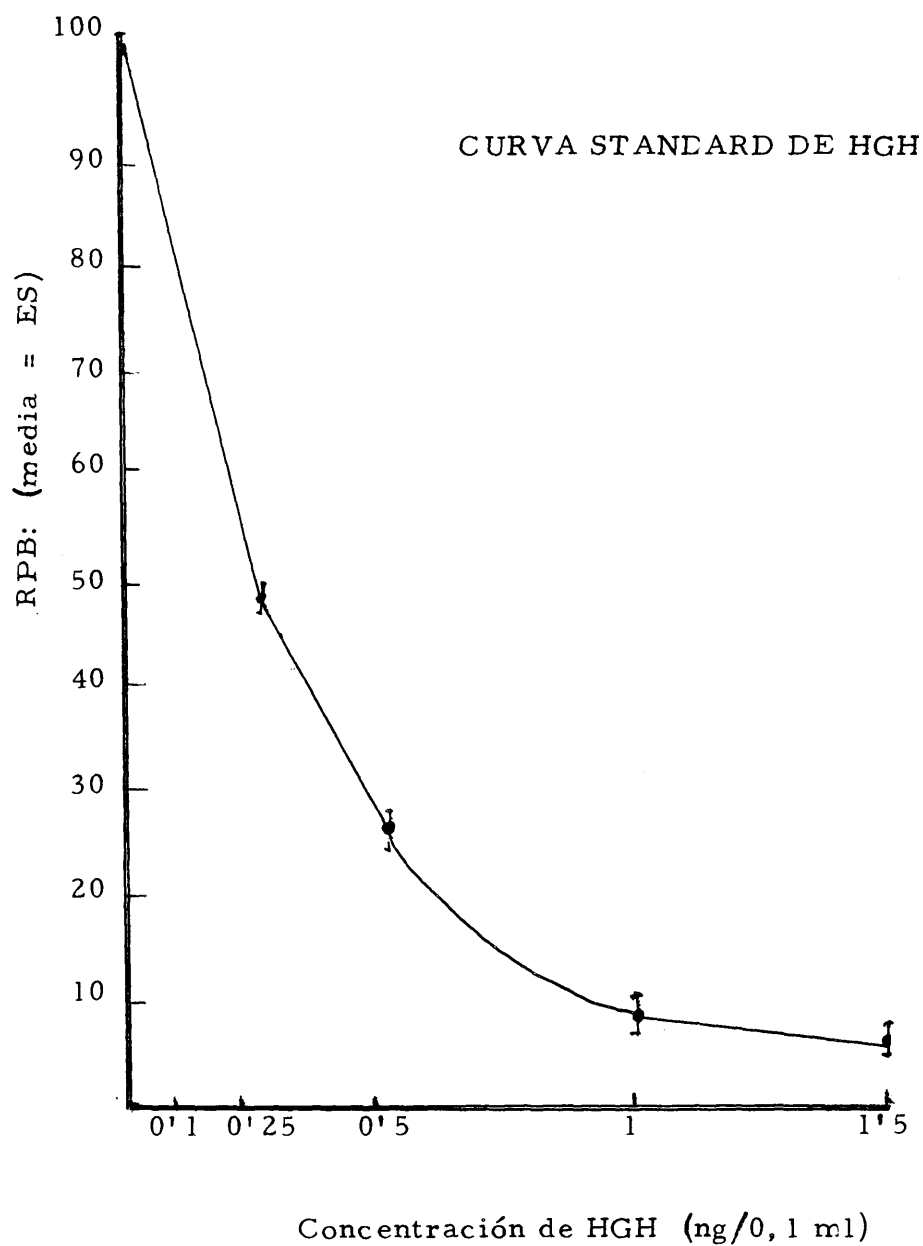
pipetas automáticas

agitador tipo Vortex

baño Maria

contador para materiales radiactivos de rayos gamma.

A continuación se reproduce la curva standard de la concentración de HGH y el protocolo de este análisis, como ejemplo aplicable a todas las técnicas expuestas, con las variaciones que pudieran corresponder a cada una.



Curva Standard de HGH. En ordenadas se representan los RPB y en abscisas la concentración de HGH en ng/0,1 ml.

PROTOCOLO RIA HGH

Tubos	Anti-EGH	HSA-5%	Standard	Problemas	HGH-I-125	2º Anti-HGH
A- Ceros	1-2-3	0,1	0,2	-	0,1	0,1
B-Standard (ng/0,1 ml)	4-5-6	0,1	0,05:0,1	-	0,1	0,1
	7-8-9	"	0,125: "	-	"	"
	10-11-12	"	0,25: "	-	"	"
	13-14-15	"	0,50: "	-	"	"
	16-17-18	"	1,00: "	-	"	"
C -Proble- mas	19-20-21	0,1	-	0,1	0,1	0,1
	•••••			1/3-1/20		
	91-92-93	"	-	"	"	"
D-Control fijación	94-95-96	-	0,3	-	0,1	0,1
E-Control radioacti- vad total.	97-98-99	-	0,3	-	0,1	0,1

III b) Determinación de glucosa en suero

Fundamento

Las aldohexosas en medio ácido acético glacial reaccionan con la orto-toluidina produciendo una coloración verde que es debida a la formación de una base de Schiff y glucosimina. Esta coloración permite medir la glucosa mediante métodos de colorimetría.

Reactivos

60 ml. de Orto-toluidina

240 ml. de Acido acético glacial

1.5 gr. de Tiourea

La mezcla, conservada en frasco ámbar, tiene una duración de dos meses.

Metodología

Se pipetea, en tubos de ensayo largos, la sucesión siguiente:

	Problema	Standard	Blanco
Suero	0.1	—	—
Labtrol	—	0.1 ml	—
Reacc. ORTO-TOLUIDINA	6.0 ml	6.0 ml	6.0 ml

Después de mezclar bien, se cubren los tubos con una torunda de algodón. Se ponen a hervir en Baño de María durante 7 minutos y medio. A continuación se enfrían rápidamente en chorro de agua fría. Se miden en espectrofotómetro frente al blanco, a 600 milimicras de longitud de onda y la intensidad de color da la concentración de la muestra problema, conocida la concentración del standard, de acuerdo con la ley de Beer.

Utillaje

tubos largos de ensayo, pipetas normales,
baño de María, centrífuga, tubos de espectrofotometría, espectrofotómetro.

IIIc) Citodiagnóstico hormonal: colpocitograma y urocitograma

Fundamentos de las técnicas de citodiagnóstico hormonal. Estos métodos se basan en que los epitelios urogenitales actúan como órganos efectores u órganos "diana" de las hormonas gonadales, teniendo los estrógenos una acción trófica característica sobre ellos, mientras que, bajo la acción de la progesterona sufren modificaciones cualitativas. Estas acciones son paralelas a las ejercidas sobre el miometrio y otras estructuras anatómicas femeninas.

Los fenómenos de diferenciación y proliferación epiteliales produci-

dos por los estrógenos y la progesterona se reflejan en las células que se descaman y que aparecen en el extendido vaginal, dando imágenes características en las distintas etapas de la vida y en correlación directa con los niveles hormonales circulantes. Estudiando los caracteres celulares en un extendido vaginal o urinario se aprecia el efecto hormonal producido.

Debido a la acción de los estrógenos maternos la niña nace con una clara diferenciación de los epitelios vaginales en tres capas celulares: basales, intermedias y superficiales. Al quedar suprimida la acción hormonal a los pocos días de nacida, se produce una descamación celular masiva que conduce a la atrofia epitelial. Desde esta edad hasta que empieza a despertar su propia función ovárica el epitelio permanece atrófico, manteniendo solamente la capa basal.

En la premenarquia, conjuntamente con los síntomas de estimulación ovárica que se reflejan en el desarrollo somático y de los caracteres sexuales secundarios, las capas epiteliales vuelven a diferenciarse a expensas de la basal, apareciendo las intermedias y superficiales sin que se produzcan variaciones cíclicas, que se harán manifiestas cuando se instalen los ciclos menstruales. En plena época de actividad sexual, el epitelio presentará cíclicamente una fase de maduración e hipertrofia relacionada con la acción foliculínica, y otra fase de descamación relacionada con la acción de la progesterona.

Hacia el final de la vida reproductiva, el epitelio evoluciona progresivamente hacia la atrofia, y junto con el declinar de la función ovárica, van desapareciendo las capas intermedias y superficiales hasta que después de la menopausia, en un plazo variable, según la mujer, solo existe la capa basal.

Como que cada una de las capas histológicas originará un tipo determinado de célula y ésta aparecerá por descamación en los extendidos vaginales, determinando por conteo microscópico el porcentaje de células que predominan, se infiere la acción de la hormona predominante o la falta de acción hormonal. Es lo que constituye el colpocitograma.

A nivel del trígono vesical y de la uretra, se encuentran islotes de tejido pavimentoso estratificado, que tienen la misma génesis embrionaria que la vagina, que responden igual que ésta a la acción de las hormonas sexuales y cuyas células descamativas aparecen en el sedimento urinario. Estas circunstancias han permitido la elaboración de otra técnica citológica de valoración hormonal, el urocitograma, cuyas imágenes citológicas son superponibles en líneas generales a las del colpocitograma (Lencioni y otros).

Para tipificar las células se tiene en cuenta su tamaño, forma, afinidad tintoreal, y caracteres del núcleo celular, habiéndose separado los cuatro grupos siguientes: teñidos con la coloración tetracrónica de Shorr.

- A) Células cianófilas profundas: se tiñen de color azul intenso, son pequeñas, redondas, con núcleo grande que ocupa casi todo el cuerpo celular. Su presencia en los extendidos significa pobre o nula estimulación hormonal. Normales: en la niñez, menopausia, castración artificial, tratamientos con andrógenos post-parto. Anormales: en época de actividad sexual.
- B) Células cianófilas intermedias: se tiñen de color azul claro, son de tamaño mediano, ovals, con núcleo globuloso y provisto de cromatina nuclear. Su predominio significa moderada estimulación hormonal estrógeno-progesterona. Normales: en el ciclo sexual antes y después de la ovulación, premenarquia y premenopausia, embarazo, tratamiento estrogénico moderado. Anormales: en ciclos sexuales patológicos en que hay poca estimulación hormonal.
- C) Células cianófilas superficiales: se tiñen de azul claro, son grandes, poligonales, con el núcleo puntiforme (picnótico), opaco y desprovisto de cromatina. Su predominio significa buena estimulación hormonal. Normales: en la fase foliculínica, inmediatamente después de la ovulación. Anormales: en ciclos no ovulatorios cuando persisten en la fallida fase progestacional y en embarazos patológicos.

D) Células eosinófilas superficiales: solo se diferencian de las anteriores en que se tiñen de rojo, en lugar de azul. Representan un período de maduración más avanzado que las cianófilas superficiales, por lo que su predominio es signo de buena u óptima estimulación hormonal, y cuyo porcentaje da el llamado "índice eosinófilo".

La suma de las células eosinófilas superficiales ("índice eosinófilo") más las cianófilas superficiales constituye el "índice cario-picnótico".

Para el estudio hormonal por medio de las células descamativas hay que tener en cuenta además: (a) que las células se presenten aisladas (significa acción estrogénica), agrupadas (acción progestacional), extendidas (acción estrogénica), plegadas (acción progestacional), escasas (pobre estimulación hormonal), abundantes (buena estimulación hormonal); y (b) que en los extendidos pueden aparecer otros elementos normales y anormales con significado hormonal o no.

Imágenes citológicas de cada etapa sexual

Conocidos los tipos celulares ha de saberse que en los estudios citológicos hormonales puede describirse una imagen característica para cada una de las épocas de la vida sexual femenina y que son las siguientes:

En la niña recién-nacida, hasta el 15^o día: En relación con la estimulación estrogénica materna y con signos de mastodinia y de metrorragia por privación estrogénica en un elevado porcentaje, la imagen citológica suele ser TROFICA:

- con índice eosinófilo de un 15%
- índice cariopictórico de un 20%
- presencia de eritrocitos

Desde los 15 días hasta los 8 ó 9 años: Durante este período, o de INFANCIA, por la falta de grandes cantidades de estrógenos mensurables, la imagen citológica es ATROFICA, presentando:

- gran porcentaje de células cianófilas profundas
- algunas células cianófilas intermedias
- abundantes leucocitos, que dan al preparado aspecto "sucio"

Desde los 10 a los 16 años: La terminación de la infancia (premenarquia) marca el comienzo de la PUBERTAD, la cual termina con la completa madurez somática. En una primera fase de la misma aparecen los caracteres sexuales secundarios, tales como desarrollo de las glándulas mamarias (telarquia) y aparición del vello en axila y pubis (pubarquia), y como acontecimiento más importante aparecen las primeras menstruaciones (menarquia) en una edad variable según condi-

ciones climáticas, étnicas y nutricionales, etc. En relación con estos hechos que coinciden con un aumento de los estrógenos circulantes, de las gonadotropinas y de los 17 cetosteroides, la citología presenta modificaciones que la convierten paulatinamente de ATROFICA en TROFICA:

- el porcentaje de células profundas disminuye
- aumentan primero las células intermedias y después las superficiales
- los leucocitos tienden a desaparecer y el aspecto de los preparados es "limpio"

Se observa con frecuencia que aunque por el estímulo diencefálico sobre la hipófisis las gonadotropinas producidas conducirán a la maduración de folículos primordiales ya existentes, determinando la función incretora de la glándula, y por tanto la producción de estrógenos, no se llega a producir la función generativa con deshicencia folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo. Al no producirse progesterona, las imágenes citológicas pueden ser de insuficiencia progestacional total o parcial.

Estos ciclos anovulatorios se consideran normales, siendo las primeras metrorragias producidas por deprivaciones hormonales.

En esta época se observa que la corteza suprarrenal sufre un aumen-

to de peso y por consiguiente un incremento de su actividad funcional, aumentándose la producción de esteroides suprarrenales, y entre ellos de andrógenos, necesarios para el desarrollo somático, dando lugar a lo que se denomina adrenarquia. No se puede mediante la citología, sin embargo, detectar ningún efecto epitelial definitivo de los andrógenos en los epitelios mucosos.

En esta edad es frecuente la incidencia de hipertrichosis, acné y obesidad, y también de las imágenes hipotróficas con trastornos del ritmo y la persistencia de ciclos monofásicos, lo que le da validez al método para, por medio de las imágenes celulares, llegar al diagnóstico del problema.

Desde los 18-20 años a los 38-40 años: Es la época de la reproducción, que comienza con el primer ciclo bifásico y termina con el cese de la función generativa. Se presentan simultáneamente las funciones incrementadora y generativa.

La producción cíclica de hormonas sexuales y de ovulación se refleja en la citología, dando lugar a las siguientes fases:

- Fase menstrual: caracterizada por la presencia de glóbulos rojos.

- Fase post-menstrual: Eosinofilia escasa, alcanzando solo un 20%. Predominio de células cianófilas inter-

medias, células aisladas, sin plegaduras.

- Fase ovalutoria: Eosinofilia elevada entre un 30% y un 50%. Células aisladas y planas. Preparado "limpio".
- Fase luteínica: Disminuye la eosinofilia. Predominio de células intermedias plegadas, acúmulo celular. Abundantes leucocitos, aspecto del preparado "sucio".

Técnica de citología hormonal

Este método sigue las siguientes etapas: Extracción y extensión de la muestra vaginal, fijación, coloración y lectura al microscopio.

- 1a. Extracción y Extensión de la Muestra: Se debe hacer del tercio superior de la vagina y de la cara externa del fondo de saco lateral, tomando la muestra por aspiración mediante una pipeta provista de pera de goma, una espátula de Ayre o un asa de platino. Es preferible hacerlo en esta forma para controlar el lugar de la vagina de donde se toma la muestra, pero hay casos, por ejemplo en las vírgenes, en los cuales es preferible hacerlo a través del orificio himeneal, previa separación de los grandes y pequeños labios y dirigiendo la pipeta hacia el fondo de saco lateral para aspirar el contenido de la vagina.

El material así obtenido se extiende inmediatamente en un porta-

objetos, cuidando de no manipularlo excesivamente para que conserve sus características naturales, ya que tanto la agrupación como el plegamiento celular son necesarios para apreciar la actividad progestacional.

Material para este primer paso:

- Portaobjetos numerados
- Pipetas de vidrio
- Espátulas de Ayre o asa de platino
- Espéculos
- Guantes ginecológicos
- Solución fijadora en frasco color caramelo y de reciente preparación

2a. Fijación de la Muestra: Inmediatamente de extraída de la vagina, debe introducirse en el frasco de solución fijadora, antes de que al desecarse las células pierdan sus características normales.

El fijador que se emplea habitualmente es una mezcla a partes iguales de alcohol y éter:

Alcohol 96°..... 50 ml

Eter..... 50 ml

pH normal 6,9 - 7

Se recomienda el "método de desecación", llamado así porque permite que la muestra se seque, para luego pasarla por agua y que las células recobren la hidratación perdida, y por alcohol-les ácidos para que recobren su pH.

Soluciones necesarias para las técnicas del material desecado (técnica de Kiserud, modificada por Lencioni).

Alcohol de 30° con 2% de ácidos acético glacial. Se prepara

con	alcohol de 96°.....	30 ml
	agua.....	70 ml
	ácido acético glacial.....	2 ml

Alcohol de 70° con 2% de ácido acético glacial. Se prepara

con	alcohol de 96°.....	70 ml
	agua.....	30 ml
	ácido acético glacial.....	2 ml

Alcohol de 96° con 2% de ácido acético glacial. Se prepara

con	alcohol de 96°.....	100 ml
	ácido acético glacial.....	2 ml

Xilol.

Material necesario para esta técnica:

-- Frascos de 500 ml, para contener las soluciones alcohólicas preparadas.

-- Frascos de Borrel con tapa, para sumergir los preparados en las distintas soluciones.

-- Probeta de 25 ml)
) para medir componentes de las
 -- Probeta de 500 ml) soluciones

Los pasos de la técnica cuando se hace por desecación consisten en:

Pase por alcohol de 30°..... dos minutos

Pase por alcohol de 70°..... dos minutos

Pase por el colorante..... de cuatro a ocho minutos

Lavar con agua corriente

Lavar con alcohol de 70°

Lavar con alcohol de 96°

Dejar secar y cubrir con material plástico (laca) para lectura al microscopio

3a. Coloración: Se obtiene buena coloración celular con el colorante de Shorr:

Alcohol etílico..... 100 ml

Biebrich escarlata..... 500 mg

Fast green..... 75 mg

Orange G 250 mg

Acido fosfotúngstico..... 500 mg

Acido fosfomolibdico.....	500 mg
Acido acético glacial.....	1 ml

Colocando el preparado en una gradilla de vidrio situada sobre una cubeta se cubre con el colorante, el cual se puede aplicar con un frasco gotero. También se puede introducir el preparado en un frasco de Borrel conteniendo colorante.

- 4a. Lectura al microscopio: Con aumento pequeño primero X 50 (ocular 5, objetivo 10), se apreciará: el trofismo general del preparado, clasificándolo en trófico, hipotrófico y atrófico. Con un recuento semejante al que se hace al realizar los hemogramas se establece el número de cada tipo celular y luego la proporción de los mismos en porcentaje, teniéndose en cuenta la coloración de la célula, su forma y tamaño nuclear, o sea, siguiendo los criterios indicados para tipificar los grupos celulares.

Se tendrán en cuenta:

- La agrupación celular
- Si son células planas o plegadas
- Cantidad de glóbulos rojos
- Cantidad de glóbulos blancos

De acuerdo con los resultados y con los criterios de valoración establecidos, se hará el diagnóstico hormonal. Para valorar el efecto de las hormonas estrogénicas se tiene en cuenta el "índice eosinófilo", que equivale al porcentaje de células eosinófilas, o el "índice cariopicnótico" que es la suma de las células superficiales cianófilas y eosinófilas. El efecto de la progesterona se valora por su efecto cuantitativo, como es el descenso de los índices eosinófilo y cariopicnótico; y cualitativo, como es la descamación en cúmulos, las plegaduras y el aumento de los leucocitos.

De acuerdo con el grado de trofismo se pueden dividir los colpocitogramas en:

- Atróficos:**
- De 1er. grado, cianófilas intermedias y profundas.
 - De 2do. grado, cianófilas profundas solamente (a veces también eosinófilas profundas con leucocitos abundantes: "sucios").
- Hipotróficos:**
- De 1er. grado, eosinófilas del 1 al 14%
 - De 2do. grado, no eosinófilas, cianófilas superficiales o intermedias. Pueden aparecer abundantes leucocitos.

- Tróficos: eosinófilas, desde un 15 hasta 60%
- Hipertróficos: Cuando las células eosinófilas pasan del 70%, o se mantienen entre el 30% y 70% en 4 extendidos sucesivos tomados cada tres días.

Los extendidos pueden ser además:

- Hipotróficos: con o sin variaciones. En los primeros, las modificaciones de los porcentajes celulares no siguen un ritmo y no pasan del 20% de eosinofilia. En los segundos, se mantienen bajos todo el tiempo.

Existe otra clasificación (Allende, 1957) que diferencia resultados en Anestrogénicos, Hipoestrogénicos, Normoestrogénicos e Hiperestrogénicos.

Cuando se utilizan las células epiteliopavimentosas que aparecen en la orina, el método constituye el urocitograma, y es el más aconsejable en las niñas.

Este método pasa por las fases de: Centrifugación de la orina y extensión del material, desecación, coloración previa hidratación y paso por alcoholes ácidos, y lectura al microscopio.

En términos generales la técnica no difiere de la anterior nada más

que en los dos primeros pasos.

1° Centrifugación de la orina: Se pide a la paciente orina de por la mañana al levantarse. Se deja reposar el frasco en un lugar fresco para que sedimenten las células contenidas en la orina. A las dos o tres horas se extraen con pipeta dirigida hacia el fondo del frasco, alrededor de 25 ml de orina, que se vierten en dos tubos de ensayo. Luego, se centrifugan en tubos durante diez minutos.

Extensión del material: Se decanta la orina y para unir las células sedimentadas a la gota de orina que quedó se frota el fondo del tubo con los nudillos de la mano izquierda. Esto puede hacerse también colocando el tubo en el rotamezclador, pero no se recomienda para no manipular las células con rigor. Mezclado el material que quedó en el fondo del tubo, se vierte sobre un portaobjetos seco y señalizado con un número, o bien con el nombre de la paciente y fecha de la muestra.

También puede aspirarse con pipeta de 2 ml el contenido del tubo, y colocarlo sobre el portaobjetos.

2° Desecación del Material: Se deja secar al aire durante 24 ó 48 horas.

3° Coloración

Agua.....	5 minutos
Alcohol de 30°.....	2 minutos
Alcohol de 70°.....	2 minutos
Colorante de Shorr.....	4 a 6 minutos
Se lava el exceso de colorante con agua corriente	
Se lava en alcohol de 70°	
Se lava en alcohol de 96°	
Se deja secar, se cubre con material plástico (laca)	
y se lee al microscopio	

4° Lectura al Microscopio: Igual que el Colpocitrograma. Las células son las mismas, aunque el tamaño que tienen es menor. Pero la interpretación de los resultados no difiere de la descrita para la muestra tomada a nivel vaginal.

(Ejemplo de protocolo utilizado en este estudio
para el Colpocitograma o el Urocitograma)

Nombre: _____ nº _____

Edad: _____ Ultima menstruación _____

Adultas: _____ Edad de la Menarquia _____

Ritmo menstrual _____ Tratamientos hormonales
previos: _____

Diagnósticos: _____

Fecha: _____

Método: Obtención del material por centrifugación, desecación y coloración con Shorr.

Material que corresponde al día _____ de un ciclo sexual.

Niñas:

Fórmula de porcentaje:

Células anucleadas: _____ %

Células eosinófilas superficiales: _____ %

Células cianófilas superficiales: _____ %

Células cianófilas intermedias: _____ %

Células cianófilas profundas: _____ %

Disposición:

Células aisladas: _____

Células agrupadas: _____

Células en colgajo: _____

Calidad:

Plegaduras celulares: _____

Células naviculares: _____

Desintegración ó citolisis: _____

Moco _____ Leucocitos _____ Eritrocitos

_____ Parásitos _____ Otros _____

Conclusiones: _____

Fecha: _____ Firma: _____

IV. Métodos Estadísticos

Las pruebas estadísticas empleadas en el cálculo de los resultados obtenidos en este trabajo han sido.

IV a) Parámetros o medidas dentro de un grupo.

- Media: Suma de todos los datos del grupo (X) dividido por el número de ellos (N).

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N}$$

- Desviación standard: Raíz cuadrada de la varianza, y ésta representada por DS que se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$DS = \sqrt{\frac{N\sum X^2 - (\sum X)^2}{N(N-1)}}$$

- Error standard: Es igual a la desviación standard, partida por la raíz cuadrada del número de datos menos 1.

$$ES = \frac{DS}{\sqrt{N-1}}$$

Con las medias y el error standard se confeccionaron las curvas representativas de los valores para cada grupo. Con los valores séricos basales, a los 20, 40 y 60 minutos de FSH, LH, PRL, TSH, HGH y Glucemia, y con los valores séricos basales, a los 20, 80 y 100 minutos de Cortisol de todos los sujetos dentro de cada grupo se hallaron los parámetros media, desviación standard y error standard de la media, y se confeccionaron las curvas representativas de los valores para cada grupo.

IVb) Comparación entre dos grupos de medias dependientes de la prueba de t para datos dependientes: (t dependiente), con el fin de probar la hipótesis de que las dos medias son iguales, procediendo del siguiente modo:

- Fijando un nivel de significatividad de 0'05, se calcula

t de acuerdo con la fórmula:

$$t_{\text{dep.}} = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{DS_x^2 + DS_y^2 - 2r DS_x DS_y}{n}}}$$

donde \bar{X} es la media del primer grupo

\bar{Y} es la media del segundo grupo

DS es la desviación standard

n es el número de sujetos en el grupo

r es el coeficiente de correlación.

Con el resultado se hallan en las tablas correspondientes los límites de significancia de la distribución de Student (P). Si el valor calculado para t es igual o menor que la t del 95% se acepta que las dos medias per-

tenecen a la misma población, y si es mayor ha de aceptarse que las dos medias son diferentes

IVc) Comparación entre medias independientes usando la prueba de la t para datos independientes: (t independiente), por medio de la fórmula:

$$t \text{ ind} = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\left[\frac{(n_x - 1) DS_x^2 + (n_y - 1) DS_y^2}{n_x + n_y - 2} \right] \left[\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y} \right]}}$$

donde \bar{X} es la media del grupo 1

\bar{Y} es la media del grupo 2

DS es la desviación standard

n es el número de sujetos en el grupo

El resultado de calcular la t independiente se utilizó para hallar en las tablas el límite de significancia de la distribución de Student (P), que demuestra en forma significativa la igualdad o la diferencia entre las medias correspondientes a dos grupos de datos.

RESULTADOS

- A. Resultados a partir del primero y segundo análisis estadístico.
- B. Resultados a partir del tercer análisis estadístico.

Los RESULTADOS se han dividido en la forma siguiente:

A: - RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL PRIMER ANALISIS ESTADISTICO, que consistió en hallar las medias, la desviación standard y el error standard de las medias, de los valores individuales de cada sujeto dentro del grupo en que se clasificaron para su estudio. Estos resultados se representan gráficamente en las figuras numeradas del 1 al 14. Y RESULTADOS al hallar las diferencias entre los valores basales medios (\pm el error standard de la media) y los valores medios (\pm el error standard de la media) en cada uno de los tiempos de respuesta, con el objeto de estudiar la significatividad de la misma mediante el test de la t dependiente de Student. Estos resultados se encuentran representados en las Tablas que se numeran de I a XIV.

B: - RESULTADOS DEL TERCER ANALISIS ESTADISTICO, que consistió en comparar por medio de la t de Student independiente, para grupos no pareados, los valores basales y los valores de máximo incremento tras el estímulo, en cada hormona, entre los grupos en que se clasificaron los sujetos para su estudio. Estos resultados se representan gráficamente por medio de columnas, en las figuras numeradas del 16 al 24.

A. RESULTADOS A PARTIR DEL
PRIMERO Y SEGUNDO ANALISIS
ESTADISTICO.

I. Concentraciones basales y efecto del estímulo sobre FSH

Ia) En la Tabla I, figura 1, se muestran los valores basales y los efectos del estímulo en la respuesta de FSH, en los cuatro grupos de sujetos del sexo masculino.

Partiendo de cifras basales que prácticamente coinciden en los cuatro grupos como lo demuestra la superposición de sus intervalos de variabilidad, y que no difieren de las cifras basales obtenidas para los adultos, el máximo incremento de los valores se produce en el grupo P1 a los 60 minutos, en los grupos P2 y P3-P4 a los 40 minutos y solamente en el grupo P5 se produce a los 20 minutos igual que en los adultos.

En cuanto al carácter de la respuesta en cada grupo se observa que en el grupo P1, desde valores basales de 2.90 ± 0.70 mUI/ml, la FSH sérica asciende a los 20 minutos aunque no significativamente. El ascenso es significativo a los 40 minutos y el máximo incremento con valor más significativo respecto a la basal que en el tiempo anterior, lo obtiene a los 60 minutos. La respuesta de FSH en este grupo se caracteriza por ser positiva y porque el pico de máxima respuesta se produce a los 60 minutos, siendo como se verá a continuación el pico de respuesta máxima más tardío en todos los grupos.

Tabla I

Valores basales y tras el estímulo de FSH(mUI/ml) medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo masculino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	2.90 ± 0.70 (6)	5.67 ± 1.56 (6)	6.98 ± 0.91 (6)	8.55 ± 0.98 (4)
	n	2.384	3.9070	6.3846
	t	< 0.10	< 0.02	< 0.01
F2	3.07 ± 0.53 (6)	7.03 ± 0.77 (6)	7.28 ± 1.10 (6)	7.13 ± 1.51 (6)
	n	6.5113	4.1289	3.4193
	t	< 0.005	< 0.01	< 0.02
P3-F4	3.87 ± 0.71 (7)	7.38 ± 0.70 (7)	9.24 ± 2.25 (7)	6.80 ± 1.36 (4)
	n	3.8529	2.2843	3.9861
	t	< 0.01	< 0.10	< 0.05
F5	2.57 ± 0.54 (4)	8.85 ± 1.63 (4)	8.20 ± 2.15 (4)	5.67 ± 2.39 (3)
	n	2.9551	2.1757	1.0358
	t	< 0.10	< 0.20	< 0.40
ADULTOS:	3.5 ± 1.8 (5)	8.2 ± 4.7 (5)	7.7 ± 5.7 (5)	5.3 ± 3.8 (5)

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

○ — ○ P¹
 ● — ● P²
 △ — △ P³ P⁴
 ▲ — ▲ P⁵
 □ — □ ADULTOS

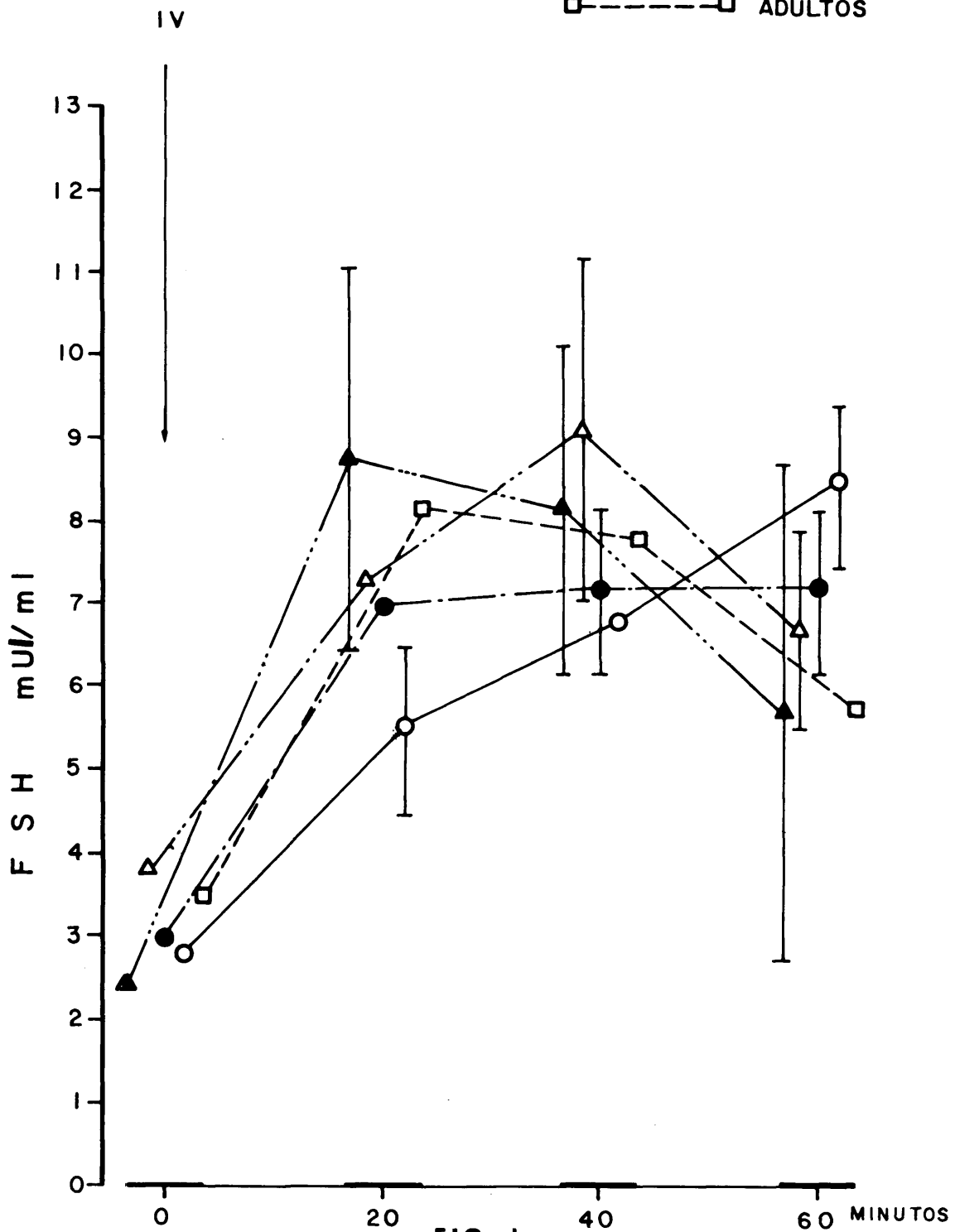


FIG. 1

Grupo P2: en este grupo, desde cifras basales de 3.07 ± 0.53 mUI/ml asciende muy significativamente tras el estímulo a los 20 minutos, a los 40 minutos tiene un ascenso significativo donde alcanza su máximo incremento, desciende a los 60 minutos aunque manteniéndose significativamente elevada respecto a los valores basales. La respuesta en este grupo se caracteriza por ser mayor que en el grupo de prepúberes y por formar una meseta al no descender como en los demás grupos a los 60 minutos, habiendo una diferencia en el tiempo de descenso de la respuesta entre este y el grupo anterior.

Grupo P3-P4: desde valores basales medios de 3.87 ± 0.71 mUI/ml ascenso significativo a los 20 minutos, alcanza su máximo incremento a los 40 minutos y desciende a los 60 minutos para mantenerse con valores significativamente altos respecto a la basal. La respuesta de ese grupo se caracteriza por ser mayor que en los grupos anteriores y alcanzar su máximo incremento a los 40 minutos, en lo cual difiere de la respuesta en los grupos de adolescentes y adultos, cuya respuesta, como se ve a continuación alcanza su nivel máximo a los 20 minutos.

Grupo P5: desde valores basales de 2.57 ± 0.54 mUI/ml la FSH sérica en este grupo asciende poco significativamente alcanzando su máximo incremento a los 20 minutos. Sus características son semejantes a las descritas en este Laboratorio para el grupo de adultos o séase, basales: medias de 3.4 ± 1.8 mUI/ml e incremento máximo a los 20 minutos.

Resumiendo: todos los individuos del sexo masculino responden significativamente al estímulo con aumentos de FSH, sin embargo el tipo de respuesta es distinto en los cuatro grupos: máximo precoz a los 20 minutos en el grupo P5, máxima algo retrasada a los 40 minutos en el grupo P3-P4, respuesta en meseta en el grupo P2 y ascenso continuo, hasta los 60 minutos en el grupo P1.

Ib) En la Tabla II, figura 2 se muestran los resultados obtenidos de esta hormona, en los cuatro grupos de sujetos del sexo femenino.

Partiendo de cifras basales semejantes, y cuyos intervalos de variabilidad se superponen con aquellos correspondientes a los adultos, las respuestas alcanzan todas su máximo incremento a los 40 minutos con las características individuales para cada grupo, siguientes:

Grupo P1: desde cifras basales medias de 2.62 ± 0.26 mUI/ml la LH sérica asciende en este grupo tras el estímulo significativamente a los 20 minutos, alcanza su máximo incremento a los 40 para descender rápidamente a los 60 minutos. La respuesta en este grupo se caracteriza por alcanzar cifra media máxima con un gran intervalo de variabilidad que da lugar a que algunos de los sujetos de este grupo muestren una respuesta al estímulo mayor que en todos los demás del sexo femenino, con un brusco descenso que no veremos repetirse en los demás grupos.

Tabla II

Valores basales y tras el estímulo de FSH(mUI/ml) medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo femenino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	2.62 ± 0.26 (4)	10.85 ± 1.72 (4)	15.34 ± 4.74 (5)	7.00 ± 1.63 (3)
n		4.5974	2.7334	3.1757
t		<0.02	<0.05	<0.10
P				
F2	2.90 ± 0.67 (4)	11.49 ± 1.49 (4)	12.88 ± 1.16 (5)	12.33 ± 3.18 (3)
		4.1257	7.3950	4.2828
		<0.05	<0.005	<0.10
P3-F4	6.10 ± 1.00 (4)	9.62 ± 3.04 (4)	12.90 ± 1.47 (6)	10.22 ± 1.25 (5)
		1.4575	4.4391	2.5175
		<0.30	<0.01	<0.10
F5	4.72 ± 0.86 (6)	7.32 ± 0.95 (6)	10.47 ± 1.57 (6)	10.00 ± 1.04 (6)
		2.5111	5.2075	10.7190
		<0.10	<0.005	<0.001
ADULTOS:	4.7 ± 2.3 (5)	9.2 ± 3.6 (5)	12.5 ± 5.7 (5)	10.2 ± 3.9 (5)

F S H Q

INSULINA 0,1 U/Kg

LHRH 100 µg

TRH 300 µg

- ——— ○ P¹
- ——— ● P²
- △ ——— △ P³ P⁴
- ▲ ——— ▲ P⁵
- ——— □ ADULTOS

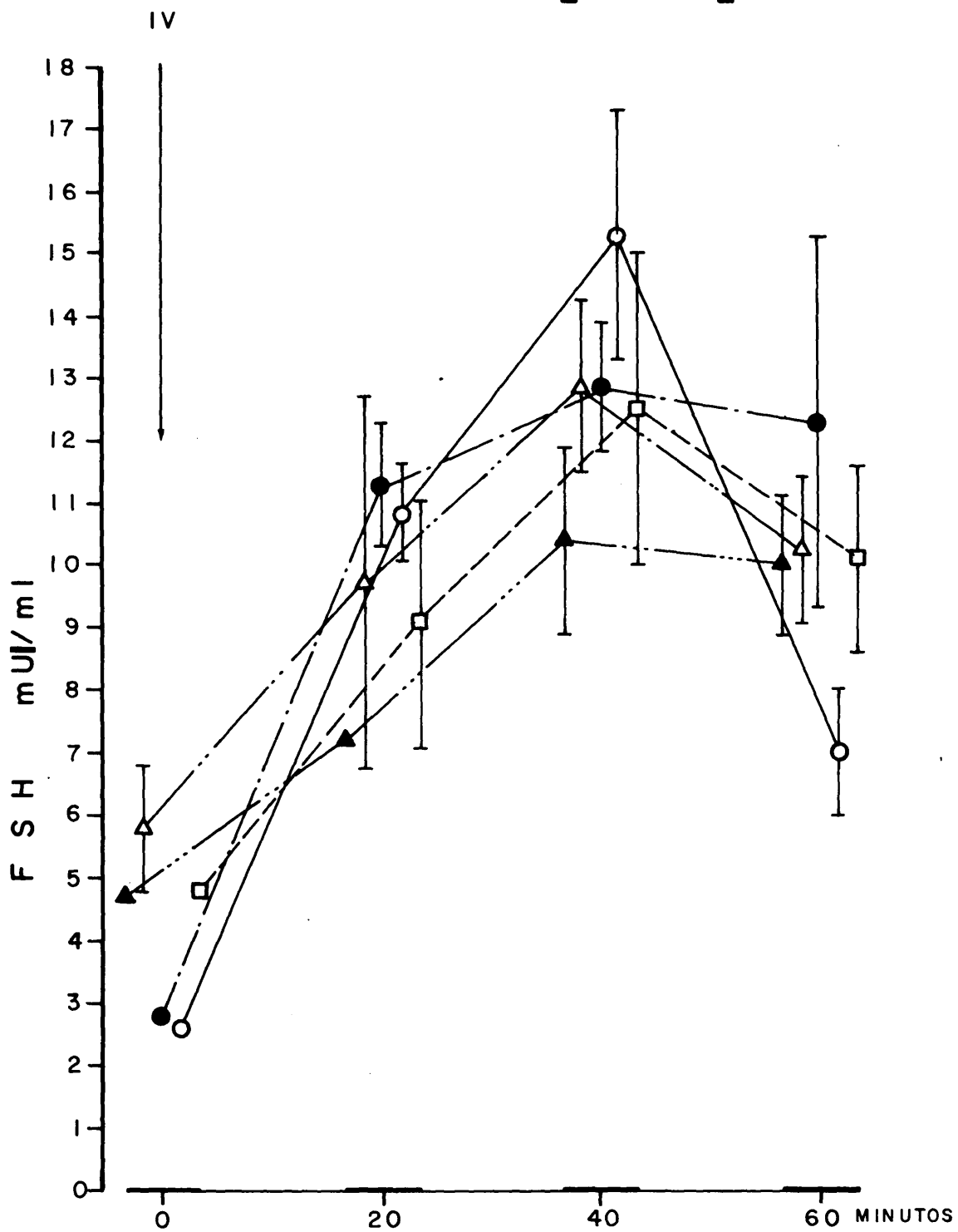


FIG. 2

Grupo P2: desde valores basales medios de 2.90 ± 0.67 mUI/ml la FSH asciende en este grupo significativamente a los 20 minutos, alcanza su incremento máximo a los 60 para descender, manteniéndose significativamente alta respecto a los valores basales, a los 60 minutos. La respuesta en este grupo, se caracteriza por alcanzar cifras medias de incremento máximo con intervalos de variabilidad dentro de los del grupo anterior, diferenciándose de la misma en que su descenso no es tan marcado.

Grupo P3-F4: desde cifras medias basales de 6.10 ± 1.00 mUI/ml, ascenso no significativo a los 20 minutos, con incremento máximo significativo a los 40 minutos, para descender a los 60 minutos. La respuesta en este grupo se caracteriza por no diferir grandemente ni en las cifras medias ni en los intervalos de variabilidad de las cifras correspondientes a los adultos.

Grupo P5: desde cifras basales de 4.72 ± 0.82 mUI/ml, asciende no significativamente a los 20 minutos, alcanza su máximo incremento, muy significativo a los 40 minutos descendiendo a los 60 minutos manteniéndose significativamente alta respecto a su valor basal. La respuesta en este grupo es la de menor magnitud de todos los grupos y menor que la obtenida para el grupo de mujeres adultas cuyo incremento máximo es también menor que en los grupos precedentes (partiendo de valores de 4.7 ± 2.3 mUI/ml con un incremento máximo a los 40 minutos de

12.5±5.7 mUI/ml) y caracteriza la respuesta obtenida en adolescentes con menarquia establecida en las cuales se ha realizado la prueba durante los primeros días de la fase folicular del ciclo.

Resumiendo: todos los individuos normales del sexo femenino responden significativamente al estímulo con aumentos de FSH, siendo el tiempo de respuesta máxima igual en todos los grupos pero con las siguientes diferencias individuales: grupo P1 alcanza una respuesta importante mayor en algunos sujetos que en el resto de los grupos con intervalos de variabilidad también importantes y un descenso brusco que no se ve en los demás grupos, en P2 la respuesta de FSH puede mostrarse más baja que en el grupo anterior, no subiendo aparentemente en este grupo con pubertad incipiente pero manteniendo cifras medias altas respecto a los grupos subsiguientes, en el grupo P3P4 sigue manteniéndose la respuesta más alta respecto a los grupos P5 con menarquia establecida y el grupo de adultas, grupos, estos 2 últimos en los cuales la respuesta corresponde a la fase folicular temprana del ciclo.

II. Concentraciones basales y efecto del estímulo sobre LH

IIa) En la Tabla III, figura 3, se muestran los resultados de LH, en los cuatro grupos de sujetos del sexo masculino.

Partiendo de cifras basales semejantes, algo más bajas en el grupo prepuberal todas las respuestas son significativas y todas alcanzan su máximo incremento a los 40 minutos. Las características individuales de cada respuesta son las siguientes:

Grupo P1: desde cifras medias basales de 3.78 ± 0.94 mUI/ml la LH asciende tras el estímulo significativamente a los 20 minutos, alcanza incremento máximo muy significativo a los 40 minutos y desciende a los 60 minutos manteniéndose en este tiempo significativamente alta respecto a los valores basales. La respuesta en este grupo es pues muy significativa pero es la menor de todos los grupos.

Grupo P2: desde valores basales de 6.20 ± 0.71 mUI/ml, el estímulo produce un aumento de LH significativos en todos los tiempos con incremento máximo a los 40 minutos con descenso a los 60 minutos, aunque significativamente alta respecto a la basal. La respuesta en este grupo es mayor que en el grupo anterior en cuanto a su magnitud y en cuanto a la amplitud de sus intervalos de variabilidad.

Tabla III

Valores basales y tras el estímulo de LH(mU/ml) medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo masculino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
F1	3.78 ± 0.94 (5)	9.06 ± 0.84 (5)	12.46 ± 0.98 (5)	11.80 ± 1.05 (4)
	n	5.7142	6.5245	
	t	< 0.05	< 0.005	< 0.01
F2	6.20 ± 0.71 (6)	33.48 ± 6.92 (6)	44.68 ± 9.84 (5)	34.60 ± 6.64 (5)
	n	4.2168	4.0324	4.3717
	t	< 0.01	< 0.01	< 0.02
P3-F4	6.12 ± 1.32 (8)	43.90 ± 8.29 (8)	50.87 ± 7.44 (8)	41.00 ± 4.93 (4)
	n	4.7022	6.1655	5.8452
	t	< 0.005	< 0.001	< 0.01
F5	4.04 ± 0.92 (5)	42.00 ± 4.86 (5)	44.40 ± 3.36 (5)	33.00 ± 3.95 (5)
	n	9.0510	14.8591	7.7677
	t	< 0.001	< 0.001	< 0.001
ADULTOS:	5.2 ± 1.3 (5)	34.7 ± 11.1 (5)	47.6 ± 21.6 (5)	31.6 ± 10.7 (5)

LH ♂

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

○ ——— ○ p¹
 ● - - - - ● p²
 △ - · - · △ p³ p⁴
 ▲ - · - · ▲ p⁵
 □ - - - - □ ADULTOS

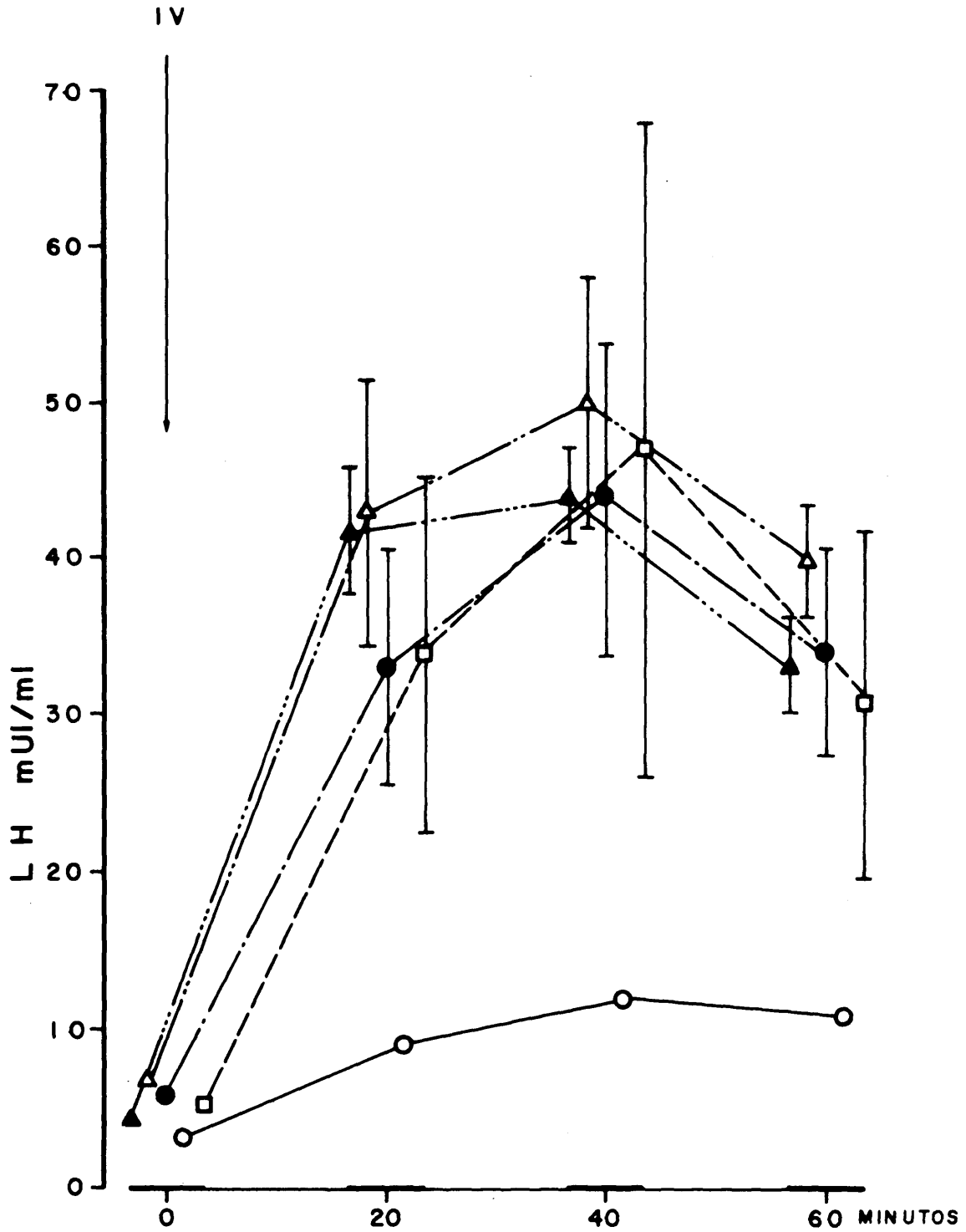


FIG. 3

Grupo P3-P4: desde cifras medias basales de 6.12 ± 1.32 mUI/ml, el estímulo produce un aumento muy significativo de LH a los 20 y a los 40 minutos donde alcanza el máximo incremento, manteniéndose significativamente elevada respecto a la basal a los 60 minutos. La respuesta en este grupo es muy significativa en todos los tiempos.

Grupo P5: desde cifras basales medias de 4.04 ± 0.95 mUI/ml, la LH tras el estímulo asciende muy significativamente en todos los tiempos alcanza su incremento máximo a los 40 minutos y se mantiene elevada respecto a la basal a los 60 minutos. La respuesta en este grupo se caracteriza por seguir de cerca las características de la respuesta obtenida para los adultos en los cuales desde cifras basales medias de 5.2 ± 1.3 mUI/ml, alcanza tras el estímulo valores máximos a los 40 minutos, descendiendo a los 60 minutos pero manteniéndose con cifras altas respecto a la basal.

Resumiendo: la LH en todos los grupos del sexo masculino responde significativa al estímulo siendo la respuesta menor y con intervalos de variabilidad menores, en el grupo P1, alcanzando en el grupo P2 valores mucho más elevados y semejantes al resto de los grupos.

IIb) En la Tabla IV, figura 4, se muestran los valores de esta hormona en los cuatro grupos de sujetos del sexo femenino.

Partiendo de cifras basales que tienden a aumentar con el avance de

los estadios puberales, la respuesta al estímulo significativa en todos los grupos alcanza su máximo incremento a los 40 minutos con las características individuales siguientes:

Grupo P1: partiendo de cifras basales de 3.42 ± 0.95 mUI/ml, la LH tras el estímulo asciende no significativamente a los 20 minutos alcanza su máximo incremento, significativo a los 40 minutos, descendiendo a los 60 minutos aunque manteniéndose aumentada significativamente respecto a la basal. Esta respuesta de LH se caracteriza por ser, como se verá más adelante, la más baja de todas en estos cuatro grupos.

Grupo P2: desde cifras basales medias de 5.30 ± 1.89 mUI/ml asciende tras el estímulo no significativamente a los 20 minutos alcanzando incremento máximo significativo a los 40 minutos, desciende a los 60 minutos donde se mantiene significativamente alta respecto a la basal. La respuesta en este grupo con ascenso más significativo que la del grupo anterior a los 20 minutos, donde comenzó a subir, alcanza máximo incremento significativo a los 40 minutos, desciende para mantenerse significativamente alta respecto a la basal a los 60 minutos.

Grupo P3-P4: desde cifras basales más altas que en los grupos anteriores de 9.47 ± 2.52 mUI/ml, la LH tras el estímulo asciende muy significativamente en todos los tiempos, alcanza un incremento máximo a los 40 minutos y se mantiene muy significativamente elevada respecto a la basal a los 60 minutos. La respuesta en este grupo es la ma-

Tabla IV

Valores basales y tras el estímulo de LH(mU/ml) medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo femenino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1				
$\bar{X} \pm E.S.$	3.42 ± 0.95	6.45 ± 1.14	7.17 ± 0.44	7.09 ± 0.46
n	(5)	(5)	(5)	(3)
t	2.0586	3.3936	3.5617	
P	< 0.20	< 0.05	< 0.02	
F2				
$\bar{X} \pm E.S.$	5.30 ± 1.89	13.33 ± 5.01	17.92 ± 2.73	13.35 ± 0.35
n	(5)	(5)	(5)	(2)
t	2.0964	3.4210	3.7692	
P	< 0.20	< 0.02	< 0.01	
P3-F4				
$\bar{X} \pm E.S.$	9.47 ± 2.52	71.36 ± 8.97	76.07 ± 8.67	68.28 ± 7.86
n	(6)	(6)	(6)	(6)
t	5.7182	7.0119	6.7524	
P	< 0.005	< 0.001	< 0.005	
F5				
$\bar{X} \pm E.S.$	9.32 ± 3.82	51.14 ± 11.54	68.80 ± 9.13	53.63 ± 10.42
n	(5)	(5)	(5)	(4)
t	3.4784	5.8461	3.0603	
P	< 0.05	< 0.005	< 0.10	
ADULTOS:	7.8 ± 3.0	43.7 ± 11.9	50.7 ± 12.1	42.0 ± 11.4
	(5)	(5)	(5)	(5)

LH ♀

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

- — ○ P¹
- — ● P²
- △ — △ P³ P⁴
- ▲ — ▲ P⁵
- — □ ADULTOS

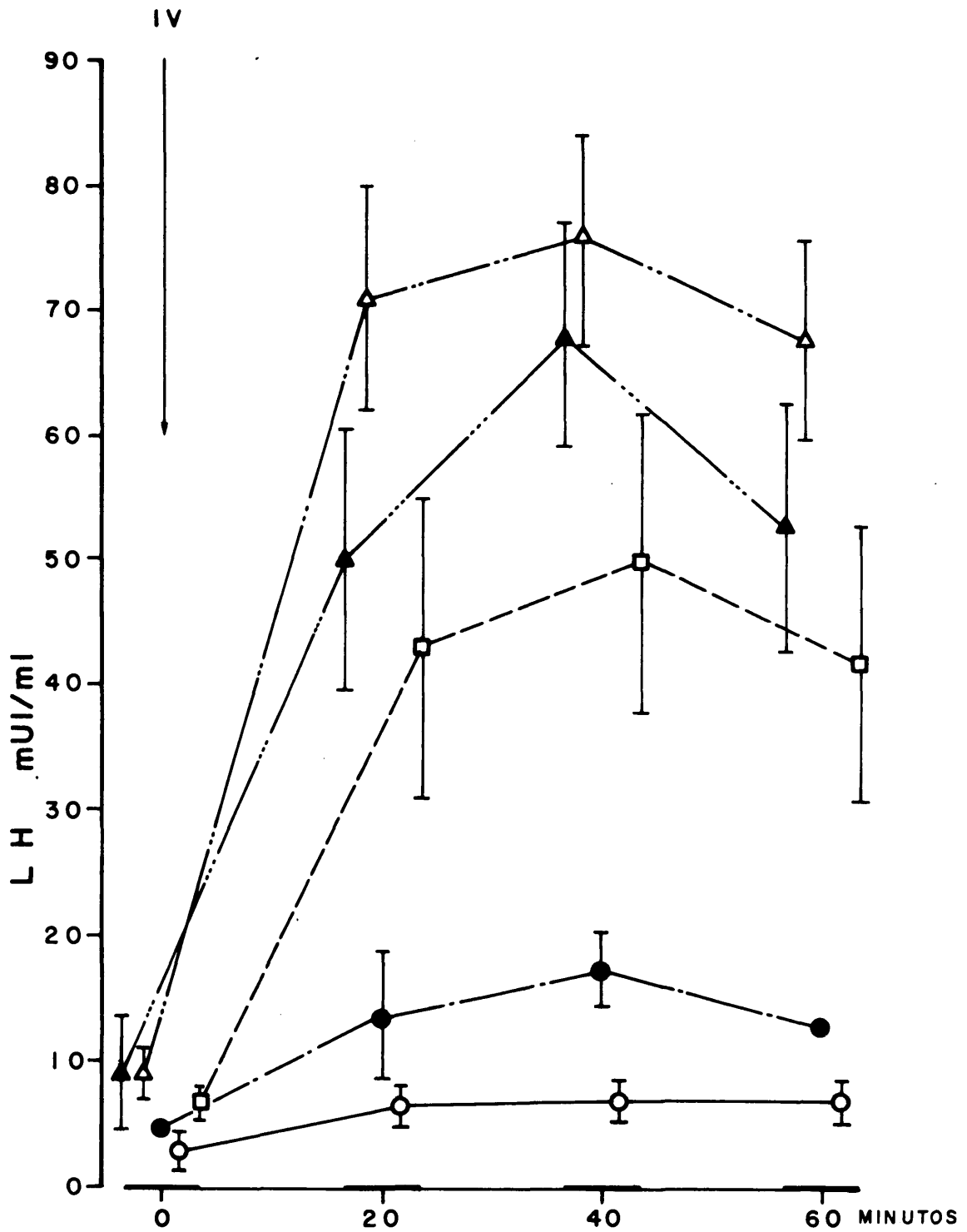


FIG. 4

yor de todos los grupos de sujetos del sexo femenino.

Grupo P5: desde cifras basales que no difieren de las del grupo anterior, 9.32 ± 3.82 mUI/ml, la LH en este grupo asciende muy significativamente en todos los tiempos alcanza máximo incremento a los 40 minutos para descender a los 60 minutos, manteniéndose solo significativamente elevada respecto a la basal. La respuesta en este grupo de sujetos, con menarquia establecida, realizada la prueba en la fase folicular temprana del ciclo, es algo menor que en el grupo anterior y más elevada que la obtenida en adultas.

Resumiendo: las respuestas de LH en el sexo femenino, tras el estímulo son: en el grupo P1 significativa, con tendencia a formar meseta y la menor de todas, en el grupo P2 aumenta sobre la anterior muy significativamente. No llega a los elevados valores que alcanza en los grupos P3-P4 y P5; en este último grupo la respuesta es aun mayor que en el grupo de los adultos y menor que en el grupo P3-P4.

III. Concentraciones basales y efecto del estímulo sobre PRL

IIIa) En la Tabla V, figura 5, se muestran los resultados obtenidos en los diferentes grupos del sexo masculino.

Las cifras basales son semejantes y coinciden con el intervalo de variabilidad de la cifra media correspondiente a los adultos. Las respuestas, tras el estímulo alcanzan su máximo incremento a los 20 minutos, con excepción de la respuesta del grupo P1 cuyo incremento máximo significativo es más tardío, y en todos los grupos excepto en el grupo P2 los valores a los 60 minutos no difieren del valor basal. Las características de las respuestas, considerado el grupo individualmente, son las siguientes:

Grupo P1: desde cifras basales de 5.90 ± 0.46 ng/ml la PRL sérica asciende tras el estímulo en este grupo significativamente a los 20 minutos alcanza su máximo incremento a los 40 minutos descendiendo a los 60 minutos. La respuesta en este grupo se caracteriza por ser significativa y tardía respecto a las demás.

Grupo P2: desde valores basales de 5.44 ± 0.46 ng/ml los niveles séricos de prolactina ascienden en este grupo muy significativamente a los 20 minutos tiempo en el que alcanza su máximo incremento, descen-

Tabla V

Valores basales y tras el estímulo de PROLACTINA (ng/ml) : medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo masculino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	5.98 ± 0.46	15.14 ± 1.82	16.52 ± 4.22	12.90 ± 2.86
n	(5)	(5)	(5)	(5)
t	4.7552	2.3229	2.1842	
P	<0.01	<0.10	<0.10	
P2	5.44 ± 0.82	19.15 ± 2.39	17.28 ± 2.39	14.98 ± 2.40
	(6)	(6)	(6)	(6)
	5.2353	4.4387	3.3843	
	<0.005	<0.01	<0.02	
P3-P4	5.43 ± 0.41	22.87 ± 2.61	21.23 ± 2.22	19.25 ± 4.71
	(6)	(6)	(6)	(4)
	6.7527	5.7608	2.5659	
	<0.005	<0.005	<0.10	
P5	7.46 ± 1.87	18.32 ± 2.70	13.36 ± 1.43	9.88 ± 1.42
	(5)	(5)	(5)	(5)
	4.8912	6.8865	2.1461	
	<0.01	<0.001	<0.10	
ADULTOS	6.3 ± 2.8	19.6 ± 4.8	16.8 ± 4.7	12.5 ± 3.9
	(5)	(5)	(5)	(5)

PRL ♂

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

○ ——— ○ P1
 ● ——— ● P2
 △ ——— △ P3 P4
 ▲ ——— ▲ P5
 □ ——— □ ADULTOS

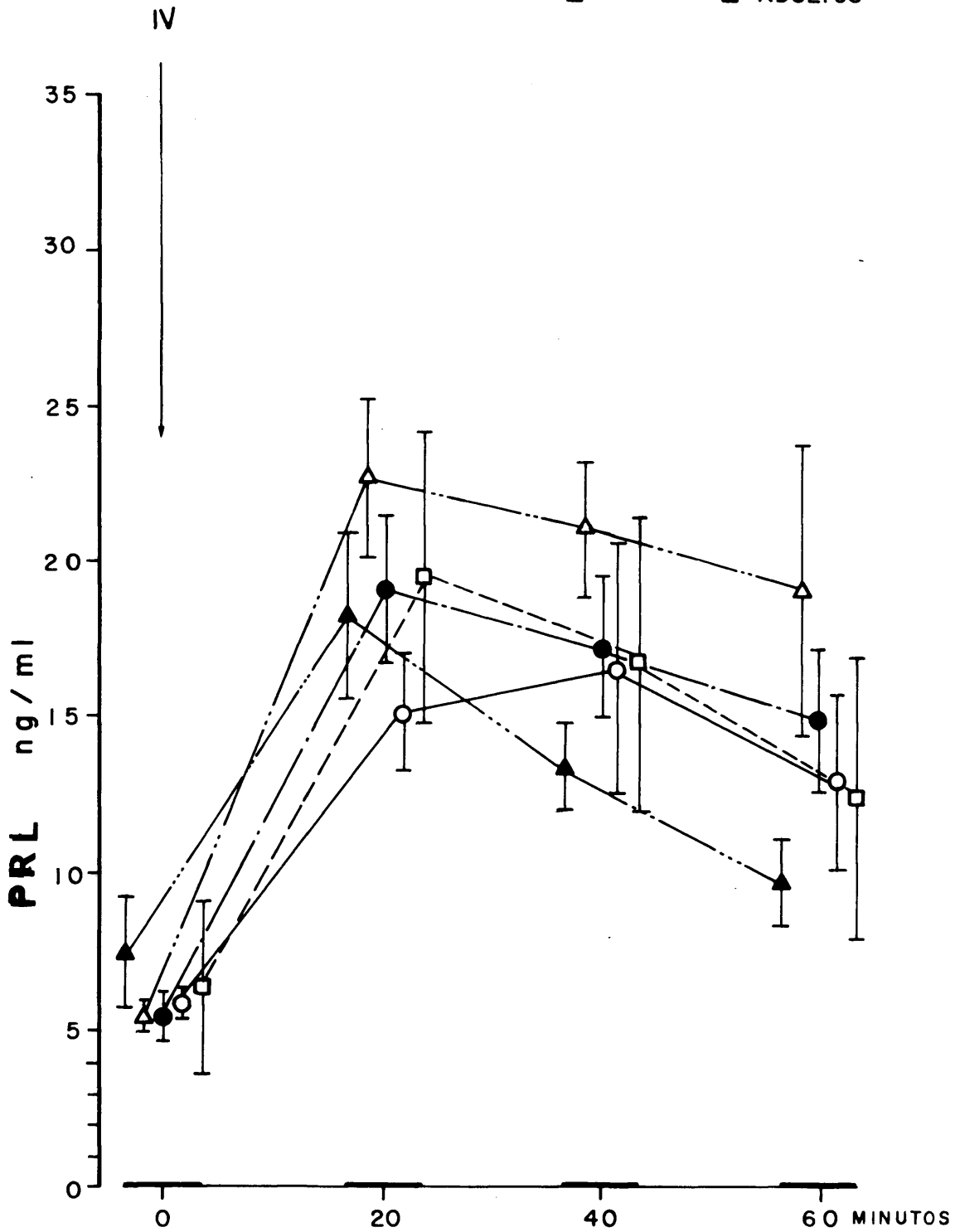


FIG. 5

diendo para mantenerse elevada respecto a los valores basales a los 60 minutos. La respuesta en este grupo es más precoz y más elevada que en el grupo anterior.

Grupo P3-P4: partiendo de valores basales medios de 5.43 ± 0.41 ng/ml, hay un ascenso muy significativo a los 20 minutos donde alcanza su máximo incremento. Se mantiene significativamente elevada a los 40 minutos y desciende sin diferencia significativa respecto a la basal a los 60 minutos. La respuesta es precoz y tan elevada como en el grupo anterior.

Grupo P5: desde valores basales de 7.46 ± 1.87 ng/ml, asciende a los 20 minutos donde alcanza el pico de respuesta máxima, se mantiene significativamente elevada respecto a la basal a los 40 minutos y desciende a cifras que no difieren de la basal a los 60 minutos. La respuesta en este grupo reproduce las características del grupo de sujetos adultos, en los cuales desde valores basales medios de 6.3 ± 2.8 ng/ml, hay un ascenso tras el estímulo a los 20 minutos, tiempo de incremento máximo a partir del cual tiene un pronunciado descenso con poco margen en los intervalos de variabilidad.

Resumiendo: las respuestas de prolactina en los sujetos del sexo masculino se caracterizan porque exceptuando la respuesta del grupo P3-P4 que ha alcanzado los niveles más elevados de todos con intervalos de respuesta también mayores y exceptuando también la respuesta del

grupo P1 que es la más baja de todas a los 20 minutos, los incrementos máximos de los grupos P2 y P5 a los 20 minutos quedan incluidos dentro de los intervalos de variabilidad del grupo de adultos. La respuesta tardía del grupo P1 a los 40 minutos tiene también sus intervalos de variabilidad en superposición con las respuestas de los demás grupos, excepto para el grupo P3-P4. En estos grupos destacan, pues, la respuesta tardía del grupo P1 y la respuesta más elevada del grupo P3-P4. En los demás tiempos y grupos las respuestas son semejantes.

IIIb) En la Tabla VI, figura 6, se muestran los resultados de PRL en los cuatro grupos de sujetos del sexo femenino.

En estos grupos partiendo de valores basales que se aprecian más bajos en el grupo de prepúberes que en el resto de los grupos y más elevados y con intervalos de variabilidad muy amplios en el grupo de sujetos con pubertad incipiente, las respuestas en todos los grupos alcanzan sus incrementos máximos a los 20 minutos. Con excepción del grupo P1, en los demás grupos los valores a los 60 minutos no difieren del valor basal. Se observan los siguientes caracteres de la respuesta, en cada grupo.

Grupo P1: desde valores basales medios de 5.24 ± 2.00 ng/ml alcanza incremento máximo significativo a los 20 minutos, comenzando a descender para mantenerse significativamente elevada respecto a la basal a los 40 y a los 60 minutos. La respuesta en este grupo es signifi-

cativa en todos los tiempos, es tan importante como en los grupos P2 y grupos de adultos que son más elevados que en los grupos P3-P4 y P5.

Grupo P2: desde valores basales medios de 9.63 ± 3.85 ng/ml asciende significativamente a los 20 minutos donde alcanza su máximo incremento, desciende a los 40 minutos y a los 60 minutos se halla con valores que no difieren de los basales. La respuesta en este grupo es tan importante como en el grupo anterior y se asemeja en importancia al grupo de adultas.

Grupo P3-P4: en este grupo desde valores medios basales de 6.65 ± 0.50 ng/ml asciende muy significativamente tras el estímulo alcanzando su máximo incremento a los 20 minutos para descender algo a los 40 minutos encontrándose a los 60 minutos con valores que no tienen diferencia significativa respecto a los basales. La respuesta en este grupo es menor que la de los dos grupos precedentes.

Grupo P5: desde cifras medias basales de 9.72 ± 1.50 ng/ml la PRL en este grupo alcanza su máximo incremento significativo a los 20 minutos se mantiene alta y sin diferir de la basal a los 40 minutos y desciende a los 60 minutos a cifras que ya no tienen diferencia significativa respecto a la basal. La característica de la respuesta en este grupo es la de ser semejante en cuanto a sus cifras medias e intervalos de variabilidad, a la respuesta del grupo precedente, diferenciándose ambas del grupo de adultas: En este último grupo la respuesta, se-

Tabla VI

Valores basales y tras el estímulo de PROLACTINA (ng/ml) : medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo femenino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	5.24 ± 2.00	25.04 ± 5.16	20.94 ± 3.17	13.88 ± 2.75
n	(5)	(5)	(5)	(5)
t	4.0318	4.3167	2.8627	
P	< 0.02	< 0.02	< 0.05	
P2	9.63 ± 3.85	27.43 ± 6.37	23.85 ± 7.37	18.00 ± 5.51
	(4)	(4)	(4)	(3)
	5.1556	2.6031	1.6237	
	< 0.02	< 0.10	< 0.20	
P3-P4	6.65 ± 0.50	21.38 ± 1.89	15.37 ± 1.73	10.96 ± 2.00
	(6)	(6)	(6)	(5)
	8.5419	5.3071	2.2144	
	< 0.001	< 0.005	< 0.10	
P5	9.72 ± 1.50	21.02 ± 3.24	18.22 ± 2.64	16.03 ± 2.86
	(6)	(6)	(6)	(6)
	3.2452	2.7145	1.7613	
	< 0.025	< 0.05	< 0.20	
ADULTOS	7.4 ± 2.7	34.8 ± 10.5	23.1 ± 7.4	21.7 ± 6.3
	(5)	(5)	(5)	(5)

PRL ♀

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

- ——— ○ P¹
- ——— ● P²
- △ ——— △ P³ P⁴
- ▲ ——— ▲ P⁵
- ——— □ ADULTOS

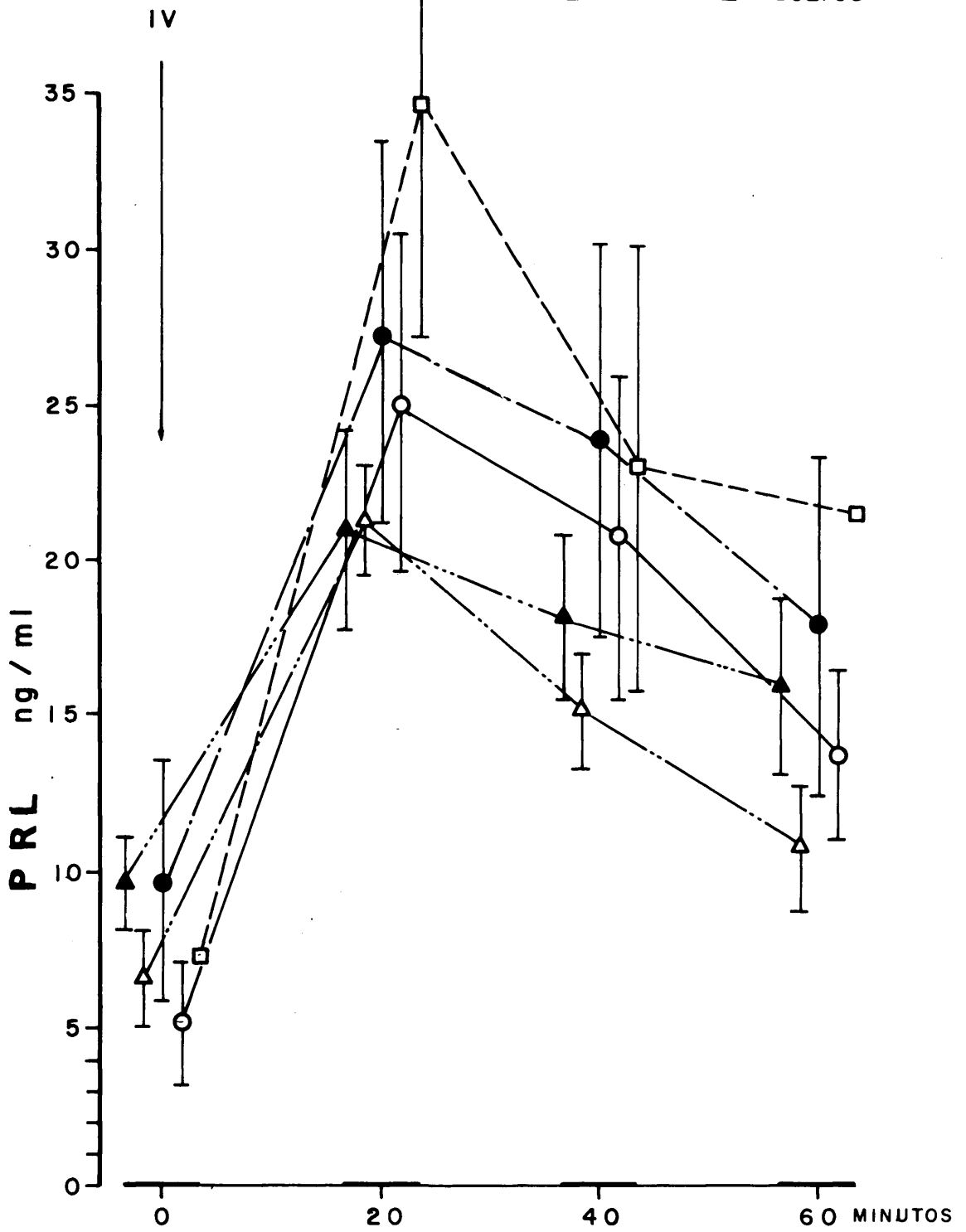


FIG. 6

gún cifras dadas por este laboratorio, es mayor que en los cuatro grupos estudiados.

Resumiendo: las respuestas de prolactina tras el estímulo en los grupos de sujetos del sexo femenino son todas significativas con incremento máximo en los grupos P1 y P2 por encima de los grupos P3-P4 y P5. Además de la diferencia encontrada respecto al grupo de sujetos adultos, en los que la respuesta es la más elevada de todas.

IV. Concentraciones basales y efecto del estímulo sobre TSH

IVa) En la Tabla VII, figura 7, se muestran valores correspondientes a los niveles séricos de tiotropina en los cuatro grupos de sujetos del sexo masculino.

Partiendo de valores basales que, excepto en el grupo P5, coinciden con los intervalos de variabilidad del valor medio correspondiente al grupo de adultos, las respuestas de TSH tras el estímulo alcanzan su máximo incremento a los 20 minutos, excepto también el grupo P5 que es más tardía y tiene su incremento máximo a los 40 minutos.

La respuesta en cada grupo es como sigue:

Grupo P1: partiendo de valores basales de 0.75 ± 0.40 ng/ml la TSH sérica alcanza tras el estímulo su incremento máximo significativo a los 20 minutos, para descender manteniéndose en cifras medias significativamente más altas respecto a las basales a los 40 y a los 60 minutos. La respuesta se caracteriza por ser significativa y ser la menor de todas.

Grupo P2: desde valores medios basales de 0.64 ± 0.19 ng/ml, en este grupo hay un ascenso significativo a los 20 minutos donde alcanza su máximo incremento, se mantiene significativamente alta respecto

Tabla VII

Valores basales y tras el estímulo de TSH (ng/ml) : medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo masculino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	0.75 ± 0.14 (6)	1.83 ± 0.27 (6)	1.52 ± 0.21 (6)	1.37 ± 0.18 (6)
		3.5035	3.7213	3.8041
		< 0.02	< 0.02	< 0.02
P2	0.64 ± 0.19 (5)	2.44 ± 0.54 (5)	2.34 ± 0.40 (5)	1.42 ± 0.27 (6)
		4.0350	5.0797	2.4311
		< 0.02	< 0.01	< 0.10
P3-P4	0.77 ± 0.05 (7)	1.82 ± 0.28 (7)	1.67 ± 0.57 (7)	1.67 ± 0.18 (6)
		3.7046	4.7144	4.6809
		< 0.02	< 0.005	< 0.005
P5	1.28 ± 0.26 (4)	2.43 ± 1.89 (4)	3.13 ± 0.65 (4)	2.08 ± 0.55 (4)
		2.9288	2.9847	1.9896
		< 0.10	< 0.10	< 0.20
ADULTOS	0.8 ± 0.2 (5)	3.1 ± 0.8 (5)	2.6 ± 0.9 (5)	1.9 ± 0.8 (5)

T S H ♂

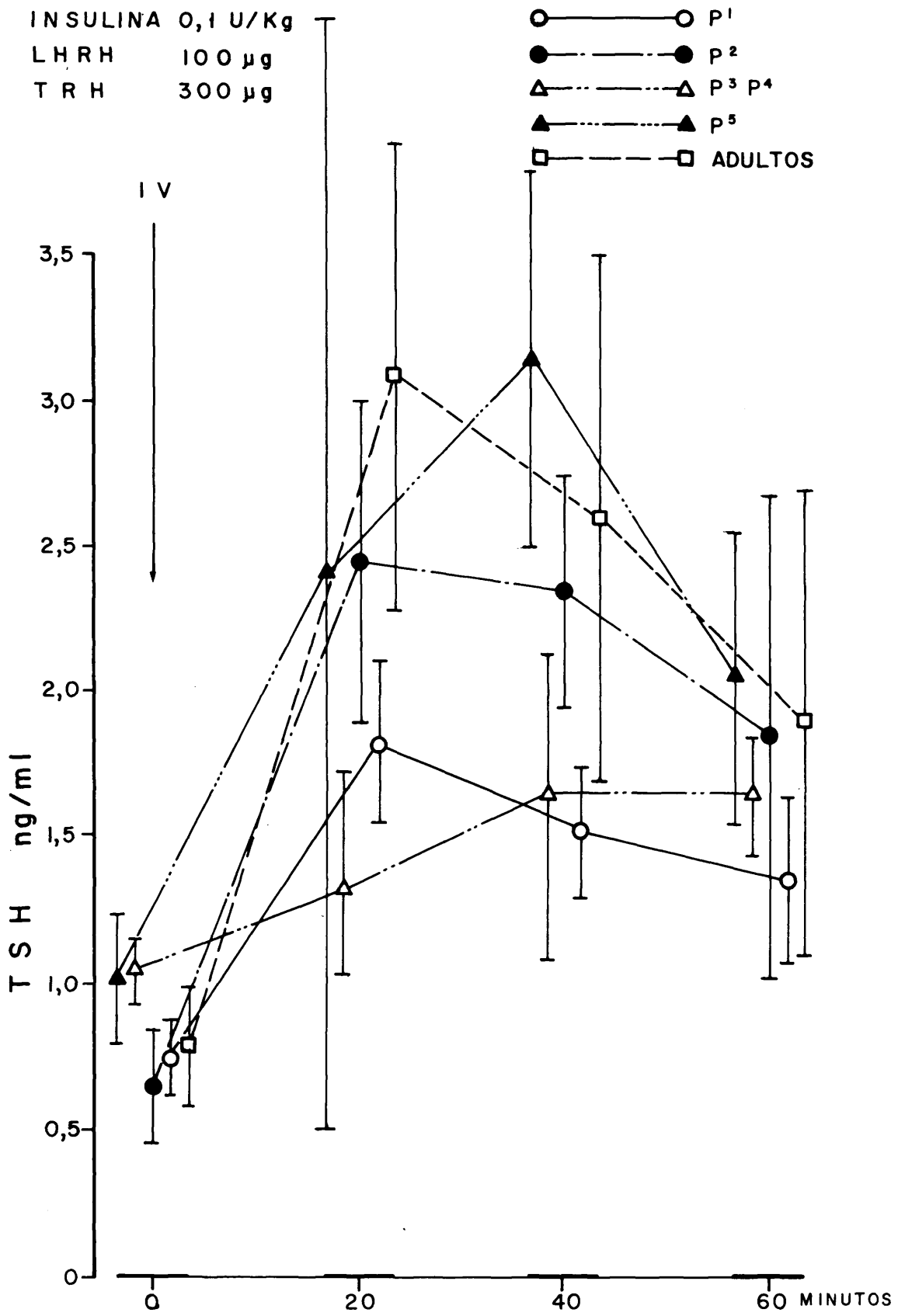


FIG. 7

a la basal a los 40 minutos y desciende a los 60 minutos sin diferir en este tiempo del valor basal. La característica de esta respuesta es la de ser mayor que la anterior manteniéndose en meseta para descender luego, rápidamente.

Grupo P3-P4: desde valores basales de 0.77 ± 0.05 ng/ml, la respuesta en este grupo es significativa a los 20 minutos donde alcanza su máximo incremento, descendiendo para mantenerse significativamente alta respecto a la basal a los 40 y a los 60 minutos. La respuesta en este grupo se caracteriza por ser menor que la anterior, contrastando como se verá más adelante con la tendencia observada en estas respuestas, a hacerse más importante a medida que avanzan los estadios puberales.

Grupo P5: desde valores basales medios de 1.28 ± 0.26 ng/ml, la TSH en este grupo responde significativamente al estímulo a los 20 minutos pero el incremento máximo lo alcanza a los 40 minutos con valores de 3.13 ± 0.65 ng/ml, descendiendo después hasta valores que no difieren significativamente de los valores basales. La característica de esta respuesta es la de ser mayor y más tardía que la anterior y por alcanzar valores semejantes --aunque más tardíos-- que en el grupo de adultos, en los cuales los valores basales de 0.8 ± 0.2 ng/ml tienen un máximo incremento a los 20 minutos descendiendo a partir de este tiempo.

Resumiendo: todos los individuos del sexo masculino responden significativamente al estímulo con aumentos de TSH, sin embargo el tipo de respuesta es distinta en los cuatro grupos: precoz en todos con excepción del grupo 5 en el cual la respuesta máxima es más tardía --partiendo de valores basales más elevado en todos los grupos-- pero cuyos valores de máximo incremento no difiere del de los adultos los que a su vez alcanzan la respuesta más elevada de todas. Más baja que la de los adultos y que el grupo P5, en el grupo P2 y más baja aún que esta en el grupo P1. Se observa pues una tendencia en la respuesta a ser mayor a medida que avanza el desarrollo de acuerdo con los grupos, con la excepción del grupo P3-P4, en el cual la respuesta ha tenido una tendencia a bajar.

IVb) En la Tabla VIII, figura 8, se muestran los valores de TSH en los cuatro grupos de sujetos del sexo femenino.

Los valores basales más bajos se observan en los grupos P1 y P2, pero no difieren de los valores basales del grupo de sujetos adultos, y las respuestas en todos tienden a mostrar valores progresivamente crecientes a los 20 minutos a medida que avanza el desarrollo puberal aunque el incremento máximo difiere siendo en algunos grupos a los 20 en otros a los 40 minutos. La característica individual de cada respuesta es como sigue:

Grupo P1: partiendo de valores basales de 0.66 ± 0.22 ng/ml, asciende aunque no significativamente a los 20 minutos para alcanzar su incremento máximo significativo a los 40 minutos, descendiendo a los 60 minutos en cuyo tiempo sus valores no difieren significativamente de los basales. Las características de esta respuesta es la de ser la menor de todas aunque significativa, pero tardía respecto a los grupos P2, P5 y adultos.

Grupo P2: desde valores basales de 0.54 ± 0.17 ng/ml, ascenso significativo a los 20 minutos donde alcanza su máximo incremento. La respuesta en este grupo asciende de tal modo que su diferencia con el valor basal es solo significativa a los 20 minutos.

Grupo P3-P4: desde valores basales medios de 1.07 ± 0.11 ng/ml, la respuesta es significativa a los 20 minutos y alcanza su máximo incremento, muy significativo, a los 40 minutos, para descender a valores no significativos respecto a la basal, a los 60 minutos. La respuesta en este grupo aunque tardía es de amplitud semejante a la del grupo P5 y mayor que en el grupo P2.

Grupo P5: en este grupo a partir de valores basales de 1.04 ± 0.22 ng/ml, la TSH sérica asciende significativamente alcanzando máximo incremento a los 20 minutos para descender a cifras que no son significativamente mayores que las basales a los 40 minutos ni a los 60 minutos. El carácter de esta respuesta es la de ser mayor que la an-

Tabla VIII

Valores basales y tras el estímulo de TSH (ng/ml)		medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo femenino.		
Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	0.66 ± 0.22	1.38 ± 0.25	1.40 ± 0.17	1.06 ± 0.11
	(5)	(5)	(5)	(5)
t	2.4931	3.3567	1.6903	
P	< 0.10	< 0.05	< 0.20	
P2	0.54 ± 0.17	1.88 ± 0.22	1.86 ± 0.62	1.87 ± 0.79
	(5)	(5)	(5)	(4)
P3-P4	1.07 ± 0.11	2.07 ± 0.34	2.53 ± 0.30	1.88 ± 0.28
	(6)	(6)	(6)	(5)
	4.2674	0.3629	1.9896	
	< 0.02	< 0.80	< 0.20	
P5	1.04 ± 0.22	2.36 ± 0.40	2.08 ± 0.86	1.66 ± 0.30
	(5)	(5)	(5)	(5)
	3.0413	6.7876	2.4839	
	< 0.05	< 0.001	< 0.10	
ADULTOS	0.8 ± 0.2	4.0 ± 0.7	2.8 ± 0.5	2.1 ± 0.8
	(5)	(5)	(5)	(5)

TSH Q

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

- ——— ○ P¹
- - - - - ● P²
- △ - - - - △ P³ P⁴
- ▲ - - - - ▲ P⁵
- - - - - □ ADULTOS

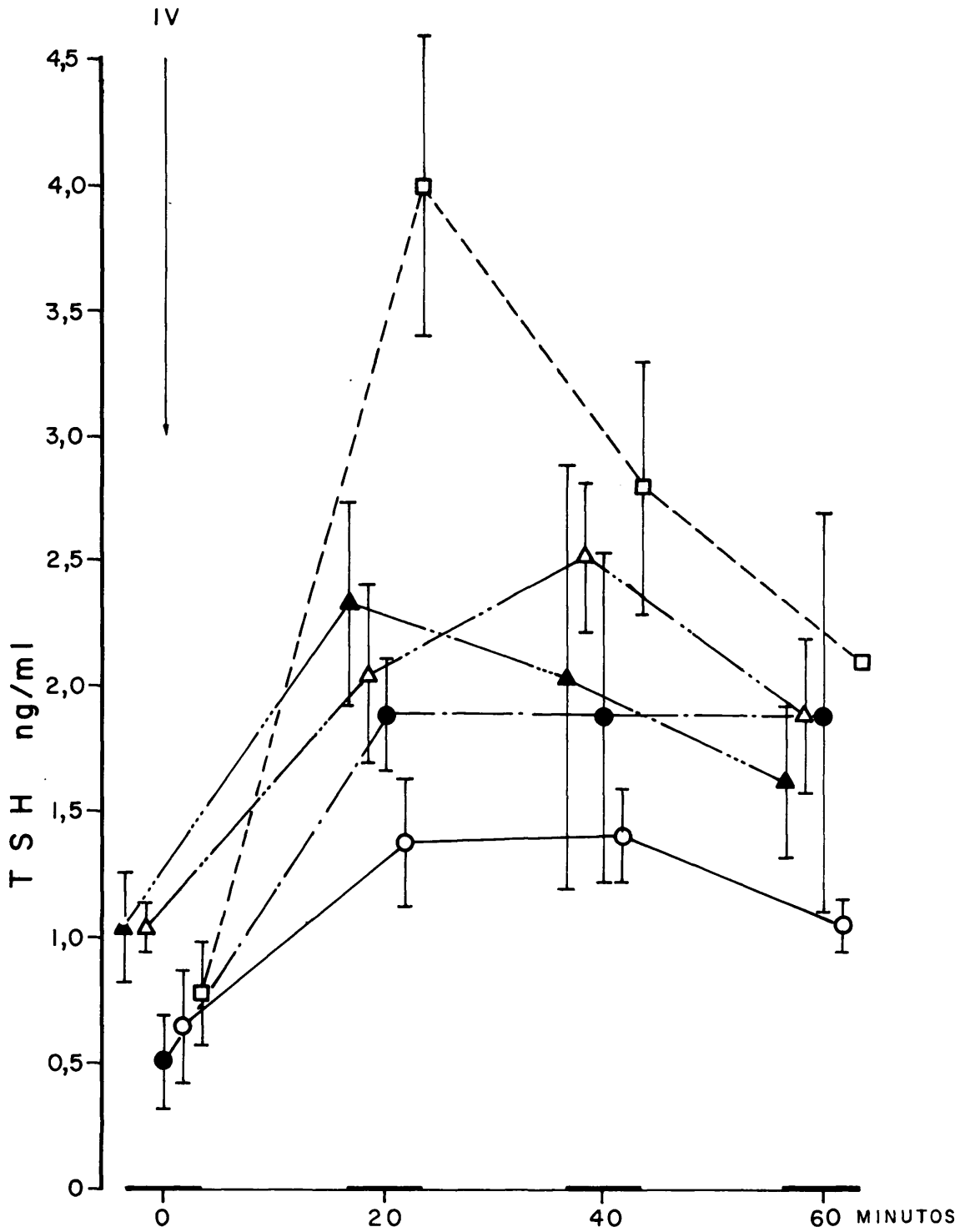


FIG. 8

terior y más tardía pero no alcanza los valores dados para el grupo de adultas que son los siguientes: desde valores basales de 0.8 ± 0.2 ng/ml incremento máximo a los 20 minutos con valores de 4.8 ± 0.7 ng/ml para descender a los 40 y 60 minutos.

Resumiendo: las respuestas de TSH en los grupos del sexo femenino han mostrado tendencia a hacerse más elevadas a medida que avanza el desarrollo sexual, con diferencias como son: ser más tardías en el grupo 5 y la diferencia señalada en cuanto a la magnitud de la respuesta en este grupo y en el grupo de adultas.

V. Concentraciones basales y efecto del estímulo sobre HGH

Va) En la Tabla IX, figura 9, se muestran los resultados obtenidos en la Hormona de crecimiento en los cuatro grupos de sujetos del sexo masculino.

Los valores basales obtenidos en todos los sujetos pertenecientes a estos cuatro grupos fueron semejantes. Tras el estímulo con excepción del grupo P3-P4 en el cual los valores se encuentran elevados significativamente a los 20 minutos, el aumento significativo se observa a los 40 minutos y en todos los grupos, continúan ascendiendo de modo que a los 60 minutos los valores son significativamente más altos respecto a los basales, excepto en el grupo P2 que en este tiempo tiene un valor que no difiere del basal. La característica de la respuesta por grupos individuales es la siguiente:

Grupo P1: partiendo de valores basales medios de 1.11 ± 0.57 ng/ml, la HGH tras el estímulo asciende significativamente a los 40 minutos alcanzando su máximo incremento a los 60 minutos.

Grupo P2: desde cifras basales medias de 0.61 ± 0.38 ng/ml ascenso muy significativo tras el estímulo a los 40 minutos con incremento máximo a los 60 minutos que no difieren del valor basal.

Tabla IX

Valores basales y tras el estímulo de HGH (ng/ml) : medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo masculino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	1.11 ± 0.57	1.51 ± 0.64	7.40 ± 1.11	8.17 ± 0.86
n	(4)	(4)	(3)	(4)
t	0.4351	6.5208	6.3070	
P	< 0.70	< 0.05	< 0.01	
P2	0.61 ± 0.38	1.29 ± 0.45	6.60 ± 1.58	15.00 ± 2.51
	(4)	(4)	(4)	(4)
P3-P4		1.2234	4.3969	2.8058
		< 0.40	< 0.025	< 0.10
	1.23 ± 0.66	4.93 ± 1.01	11.48 ± 3.05	16.54 ± 4.36
	(6)	(6)	(6)	(5)
P5		2.7876	3.0941	3.8543
		< 0.05	< 0.05	< 0.02
	0.80 ± 0.08	15.23 ± 5.24	23.95 ± 3.60	24.78 ± 4.11
	(4)	(4)	(4)	(4)
		2.7769	6.5194	5.8480
		< 0.10	< 0.01	< 0.01
ADULTOS	0.5 ± 0.3	6.7 ± 4.4	17.6 ± 7.3	24 ± 14.4
	(5)	(5)	(5)	(5)

HGH ♂

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

○ ——— ○ P¹
 ● ——— ● P²
 △ ——— △ P³ P⁴
 ▲ ——— ▲ P⁵
 □ ——— □ ADULTOS

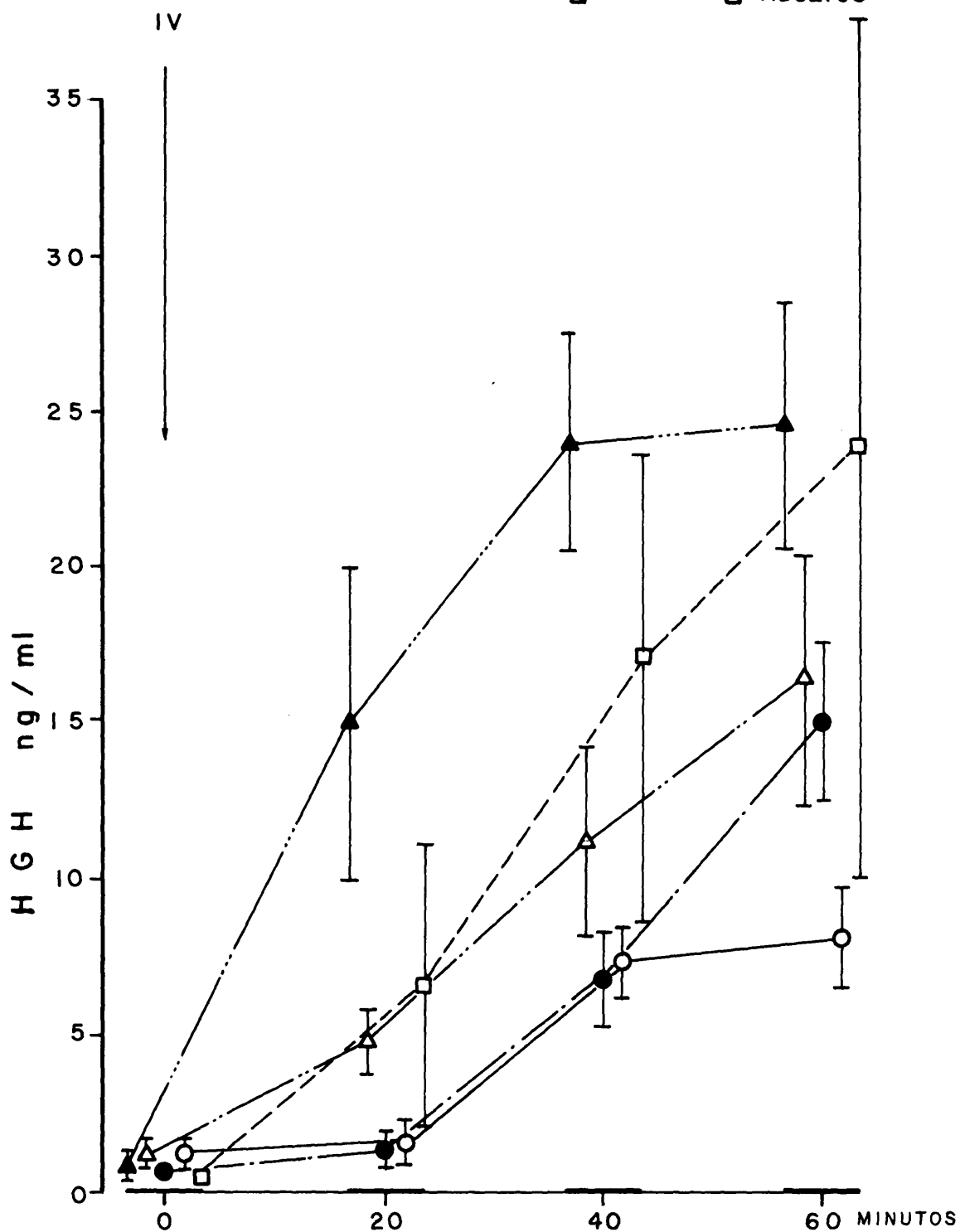


FIG. 9

Grupo P3-P4: desde valores basales de 1.23 ± 0.66 ng/ml en este grupo la HGH asciende significativamente en todos los tiempos tras el estímulo alcanzando su máximo incremento a los 60 minutos. La respuesta en este grupo difiere de las demás en el aumento significativo que muestra a los 20 minutos.

Grupo P5: se ve que desde valores basales de 0.80 ± 0.08 ng/ml, tiene un ascenso significativo a los 40 minutos, siendo el valor máximo a los 60 minutos. La respuesta en el grupo P5 es prácticamente igual que la del grupo de adultos. Son iguales en los grupos P3-P4 y P2 y la única que difiere es la del grupo P1 cuyo incremento máximo es el menor de todos.

Vb) En la Tabla X, figura 10, se muestran los valores obtenidos para la HGH en los cuatro grupos de sujetos del sexo femenino.

Los valores basales medios de estos cuatro grupos, son semejantes. La respuesta tras el estímulo fue significativa a los 20 minutos solamente en el grupo P5, ya que en todos los demás el ascenso significativo comienza a producirse a los 40 minutos y en todos alcanza su máximo incremento a los 60 minutos excepto en el grupo P5 que descendió ligeramente en este tiempo. En todos los grupos, los valores se encontraban significativamente elevados sobre los basales, a los 60 minutos. La respuesta en cada grupo muestra las siguientes características.

Tabla X

Valores basales y tras el estímulo de HGH (ng/ml) : medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo femenino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	0.59 ± 0.26	1.36 ± 0.71	4.96 ± 1.16	6.10 ± 0.33
n	(5)	(5)	(5)	(5)
t	1.1834	3.6989	13.3331	
P	< 0.20	< 0.025	< 0.001	
P2	0.17 ± 0.03	0.27 ± 0.16	7.03 ± 0.33	9.70 ± 1.39
	(3)	(3)	(3)	(3)
	0.6546	23.1768	7.0132	
	< 0.60	< 0.005	< 0.02	
P3-P4	1.10 ± 0.43	3.05 ± 1.59	5.28 ± 0.77	11.33 ± 2.69
	(4)	(4)	(4)	(3)
	1.1495	3.6491	3.3792	
	< 0.40	< 0.05	< 0.05	
P5	1.24 ± 0.30	8.86 ± 1.00	20.15 ± 4.83	12.70 ± 2.14
	(4)	(4)	(4)	(4)
	6.3749	4.0239	5.3881	
	< 0.01	< 0.05	< 0.02	
ADULTOS	0.4 ± 0.5	2.6 ± 2.2	11.7 ± 6.4	19 ± 11
	(5)	(5)	(5)	(5)

HGH ♀

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

○ — ○ P¹
 ● — ● P²
 △ — △ P³ P⁴
 ▲ — ▲ P⁵
 □ — □ ADULTOS

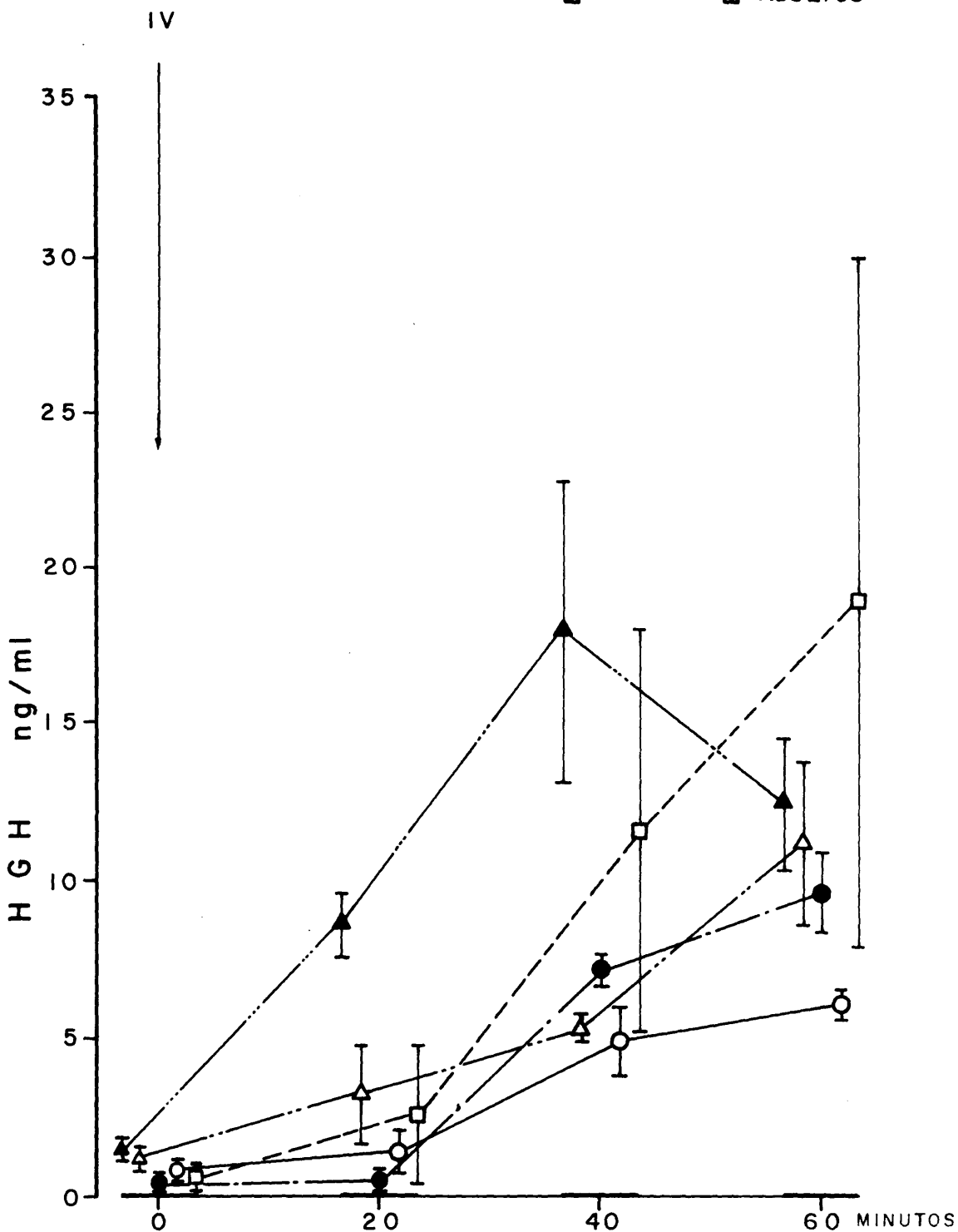


FIG. 10

Grupo P1: se observa que valores basales de 0.59 ± 0.26 ng/ml, tras el estímulo ascienden muy significativamente a los 40 y a los 60 minutos, donde alcanza su máximo incremento.

Grupo P2: desde valores basales de 0.17 ± 0.03 ng/ml, ascenso muy significativo a los 40 minutos y máximo incremento a los 60 minutos.

Grupo P3-P4: en este grupo los valores basales son de 1.10 ± 0.43 ng/ml, y ascienden tras el estímulo significativamente a los 40 y a los 60 minutos, donde alcanza su máximo incremento.

Grupo P5: desde cifras basales de 1.24 ± 0.3 ng/ml, ascenso significativo a los 20 minutos con incremento máximo a los 40 minutos, y descenso a los 60 minutos pero con cifras significativamente elevadas sobre el valor basal.

La respuesta en el grupo P5: la mayor de todas es algo más elevada que el grupo de adultos. Son muy semejantes en los grupos P3-P4 y P2 y la única que difiere es la del grupo P1, cuyo incremento máximo es el más pequeño.

En todos los sujetos de ambos grupos en los cuales se midieron los valores de HGH a los 80 minutos, éstos se encontraban tan elevados o más a los 60 minutos.

VI. Concentraciones basales y efecto del estímulo sobre Cortisol

VIa) En la Tabla XI, figura 11, se ilustran los resultados obtenidos para el cortisol, en los cuatro grupos de sujetos del sexo masculino.

Partiendo de cifras basales entre las cuales las más altas corresponden al grupo P1, claramente mayores que en el grupo P5 y en el grupo de adultos, las respuestas del cortisol tras el estímulo, medidas a los 80 minutos, no guardan diferencias significativas respecto a los valores basales con excepción de grupo P3-P4 que alcanzó en este tiempo un incremento significativo. Entre las características individuales de los valores hallados en cada grupo, sólo se destacan: las cifras basales elevadas en el grupo P1, y el ascenso significativo alcanzado tras el estímulo, a los 80 minutos, en el grupo P3-P4.

VIb) En la Tabla XII, figura 12, se muestran los valores para esta hormona en los cuatro grupos del sexo femenino: desde valores basales que son más altos en el grupo P1 que en los demás, no difieren entre si y el cortisol, tras el estímulo alcanza valores significativamente elevados sobre la basal en los grupos P1 y P3-P4, diferencias que no se observan en los grupos P2 y P5. A los 100 minutos, los valores no difieren significativamente de la basal en ninguno de los grupos.

Tabla XI

Valores basales y tras el estímulo de CORTISOL $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$: medias y error standard ($\bar{X} \pm \text{E.S.}$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo masculino.

Grupos	Basal	80 min.	100 min.
P1	24.17 ± 3.95 (4)	26.07 ± 3.99 (4)	23.56 ± 6.52 (3)
	n		
	1.1836	0.9941	
	t		
	< 0.30	< 0.40	
	P		
P2	18.30 ± 4.13 (4)	27.83 ± 4.29 (4)	24.38 ± 4.58 (4)
P3-P4	19.53 ± 2.11 (5)	26.21 ± 1.33 (5)	17.48 ± 5.28 (3)
	n		
	1.2551	1.0924	
	t		
	< 0.30	< 0.40	
	P		
P5	16.25 ± 4.75 (2)	19.25 ± 2.75 (2)	16.50 ± 5.50 (2)
	n		
	2.6789	0.2097	
	t		
	< 0.05	< 0.90	
	P		
ADULTOS	15.0 ± 3.2 (5)	23.8 ± 3.9 (5)	18.8 ± 2.6 (5)

CORTISOL ♂

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

○ ——— ○ P¹
 ● ——— ● P²
 △ ——— △ P³ P⁴
 ▲ ——— ▲ P⁵
 □ ——— □ ADULTOS

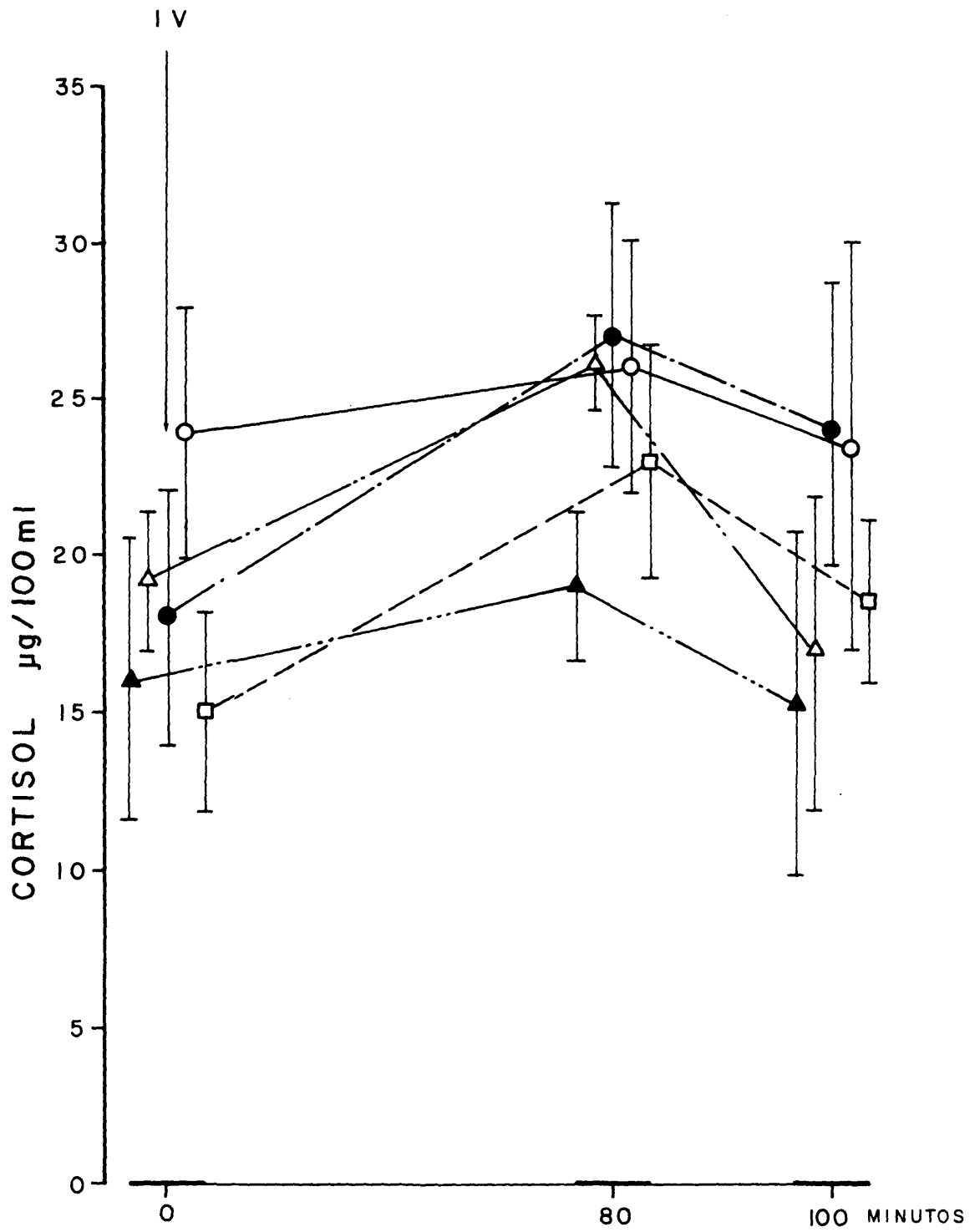


FIG. II

En cuanto a las características de las respuestas individualmente, en cada grupo se destacan: en el grupo P1 aumento muy significativo tras el estímulo a los 80 minutos con descenso a los 100 minutos con diferencias estadísticas respecto a la basal y en el grupo P3-F4 ascenso significativo a los 80 minutos con descenso también que no difiere respecto al valor basal a los 100 minutos.

Tabla XII

Valores basales y tras el estímulo de CORTISOL $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$: medias y error standard ($\bar{X} \pm \text{E.S.}$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo femenino.

Grupos	Basal	80 min.	100 min.
P1	21.88 ± 2.38	32.25 ± 2.53	19.06 ± 3.67
n	(4)	(4)	(4)
t	10.9936	1.9044	
P	< 0.001	< 0.20	
P2	13.13 ± 1.49	19.36 ± 3.69	13.13 ± 2.50
	(3)	(3)	(3)
P3-P4	12.78 ± 1.15	16.86 ± 2.30	13.74 ± 1.04
	(5)	(5)	(5)
	2.7790	1.0376	
	< 0.025	< 0.30	
P5	21.83 ± 1.83	28.13 ± 3.12	19.67 ± 5.78
	(3)	(3)	(3)
	2.6519	0.5126	
	< 0.10	< 0.70	
ADULTOS	14.1 ± 1.6	25.5 ± 2.9	26.8 ± 3.9
	(5)	(5)	(5)

CORTISOL ♀

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

○ — ○ P¹
 ● — ● P²
 △ — △ P³ P⁴
 ▲ — ▲ P⁵
 □ — □ ADULTOS

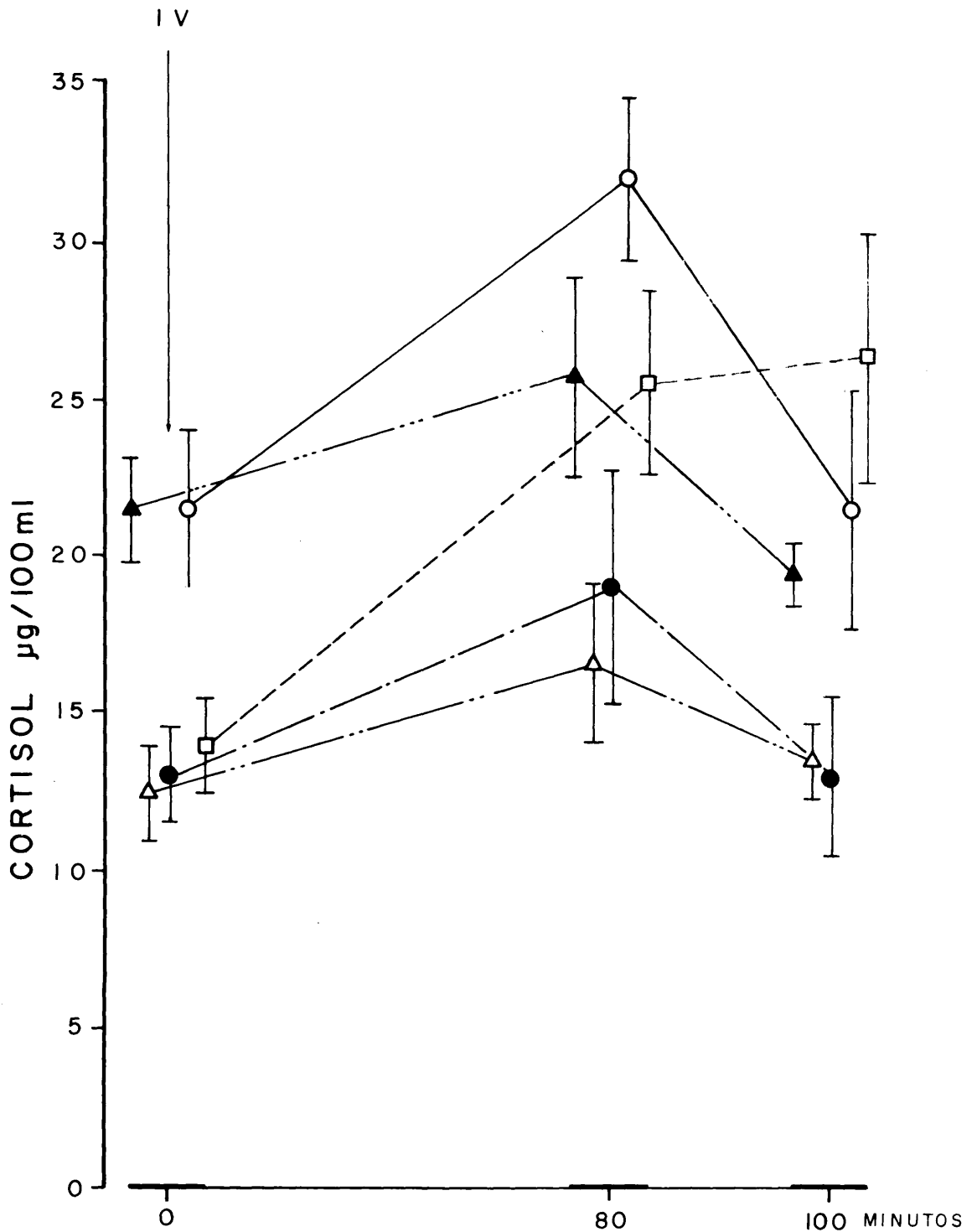


FIG. 12

VII. Concentraciones basales y efecto del estímulo sobre la Glucemia

VII) En las Tablas XIII y XIV, y en las figuras 13 y 14, se muestran los valores de glucemia basales y tras el estímulo obtenidos en los grupos de ambos sexos. En los grupos de uno y otro sexo a los 20 minutos se produce la máxima hipoglucemia.

Como característica individual en las respuestas es de destacar:

Sexo masculino, en los grupos P1 y P3-P4, los valores de la glucemia a los 60 minutos son significativamente inferiores a los basales y en los grupos P2 y P5, no hay diferencia significativa, en este tiempo, respecto a los valores basales. En los sujetos del sexo femenino con máximo descenso de la glucemia a los 20 minutos, a los 60 minutos los valores no difieren ya del valor basal en todos los grupos menos en el grupo P1, en el cual en este tiempo sigue siendo significativamente diferente del mismo.

Tabla XIII

Valores basales y tras el estímulo de GLUCEMIA mg/100 ml : medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo masculino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	84.25 ± 4.33	34.90 ± 4.85	55.00 ± 4.23	67.42 ± 7.29
n	(6)	(6)	(6)	(6)
t	11.3100	8.8816	4.6080	
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
P2	85.75 ± 5.36	40.50 ± 4.66	62.25 ± 3.36	72.50 ± 4.50
	(4)	(4)	(4)	(4)
	6.8558	2.7873	1.7910	
	< 0.001	< 0.05	< 0.20	
P3-P4	84.50 ± 2.50	39.79 ± 4.64	59.57 ± 3.14	72.64 ± 3.81
	(7)	(7)	(7)	(7)
	10.5818	8.0157	4.0907	
	< 0.001	< 0.001	< 0.005	
P5	87.00 ± 3.08	54.75 ± 6.90	58.25 ± 6.17	70.75 ± 9.01
	(4)	(4)	(4)	(4)
	4.7865	3.3711	1.5237	
	< 0.005	< 0.02	< 0.20	
ADULTOS	86.79 ± 3.32	43.62 ± 4.56	35.12 ± 4.90	70.75 ± 3.56
	(5)	(5)	(5)	(5)

GLUCEMIA ♂

INSULINA 0,1 U/Kg
 LHRH 100 µg
 TRH 300 µg

○ ——— ○ P¹
 ● ——— ● P²
 △ ——— △ P³ P⁴
 ▲ ——— ▲ P⁵
 □ ——— □ ADULTOS

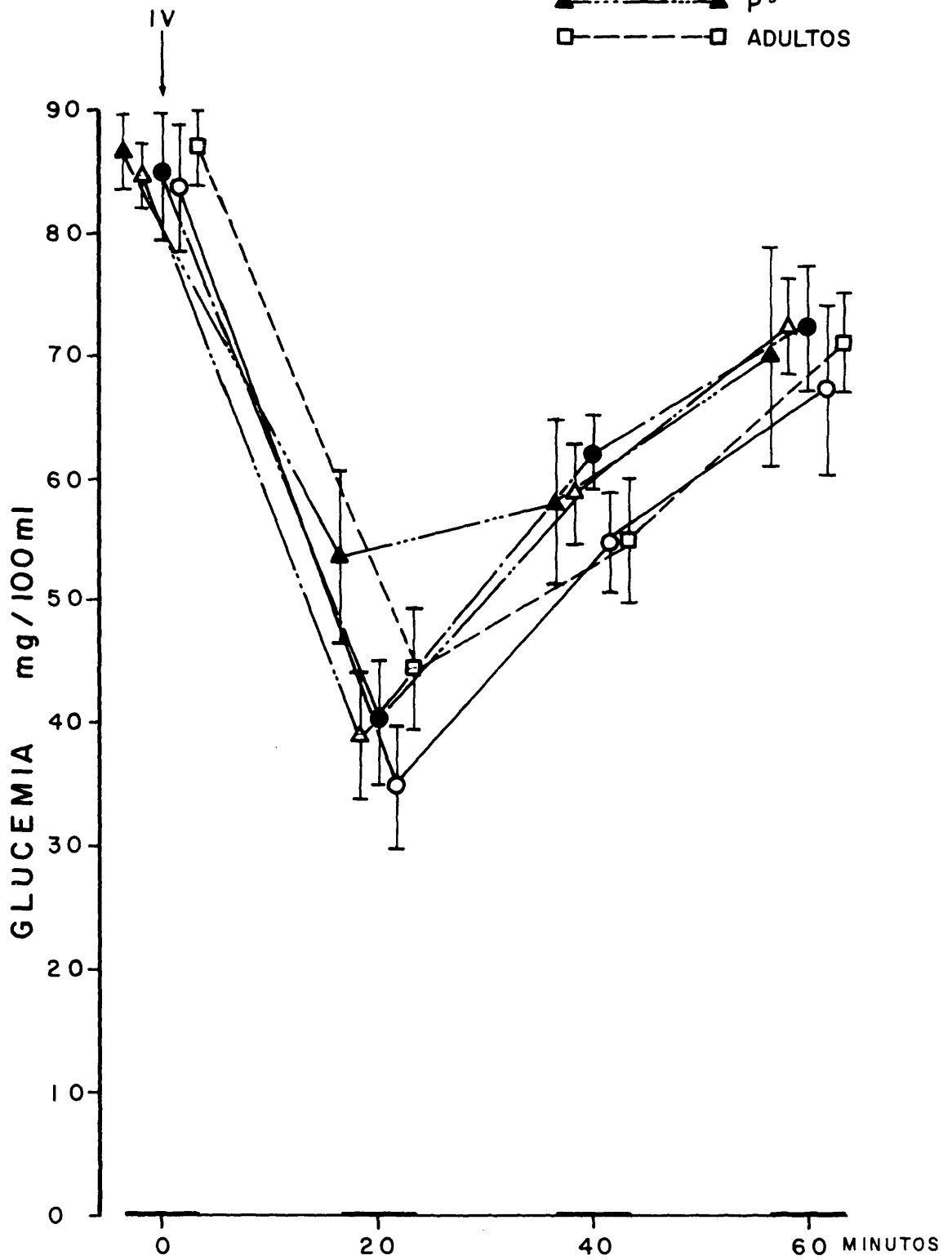


FIG. 13

Tabla XIV

Valores basales y tras el estímulo de GLUCEMIA mg/100 ml : medias y error standard ($\bar{X} \pm E.S.$), número de sujetos (n), test de Student (t) y significación estadística (P) en los grupos de niños del sexo femenino.

Grupos	Basal	20 min.	40 min.	60 min.
P1	79.00 ± 1.90 (5)	32.70 ± 2.32 (5)	57.80 ± 5.33 (5)	64.60 ± 4.53 (5)
		19.6709	4.4457	3.8133
		< 0.001	< 0.005	< 0.01
P2	82.00 ± 3.00 (3)	30.00 ± 7.37 (3)	46.33 ± 8.96 (3)	57.33 ± 9.93 (3)
		11.2583	5.9629	3.5318
		< 0.01	< 0.05	< 0.10
P3-P4	79.75 ± 2.76 (6)	45.67 ± 3.39 (6)	64.83 ± 2.64 (6)	69.67 ± 7.98 (6)
		6.1440	3.7598	1.0323
		< 0.001	< 0.005	< 0.40
P5	82.00 ± 4.12 (5)	39.80 ± 1.83 (5)	59.00 ± 4.45 (5)	75.50 ± 1.34 (5)
		7.7123	6.0821	1.1384
		< 0.001	< 0.001	< 0.30
ADULTOS	86.08 ± 2.43 (5)	38.59 ± 4.18 (5)	54.78 ± 4.59 (5)	67.12 ± 4.36 (5)

GLUCEMIA ♀

INSULINA 0,1 U/Kg
LHRH 100 µg
TRH 300 µg

- — ○ P¹
- — ● P²
- △ — △ P³ P⁴
- ▲ — ▲ P⁵
- — □ ADULTOS

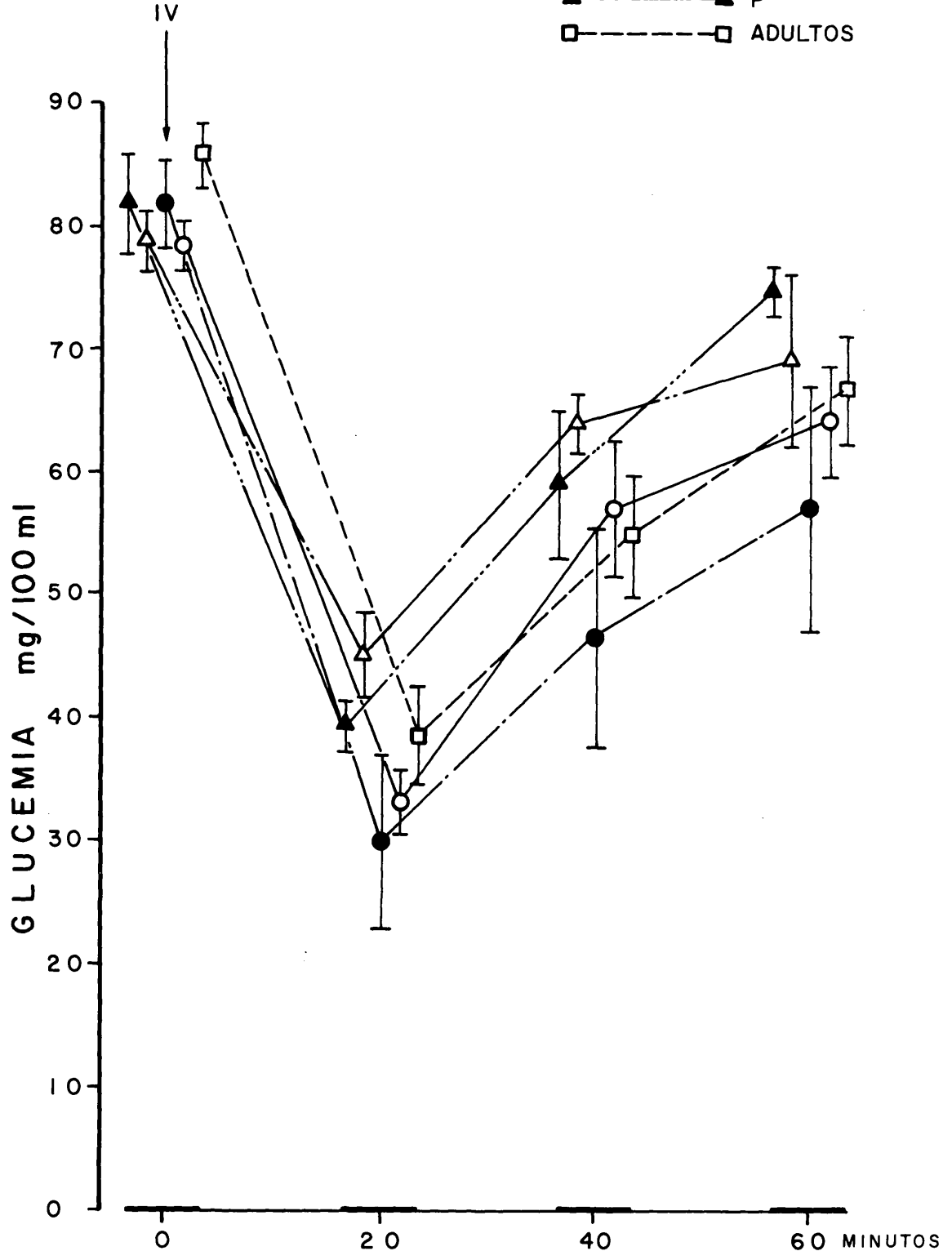


FIG. 14

B RESULTADOS A PARTIR DEL
TERCER ANALISIS ESTADISTICO.

En esta segunda parte se detallan los resultados obtenidos al comparar, por medio de la t de Student independiente, los valores basales y los incrementos máximos tras el estímulo de las siguientes hormonas: FSH, LH, PRL, TSH y HGH, entre los diferentes grupos en que se clasifican los sujetos para el estudio. En el caso de la glucemia se compararon además de los valores basales y los valores de la respuesta hipoglucémica, los valores obtenidos a los 60 minutos, para apreciar el estado de recuperación de la glucemia sanguínea en ese tiempo y ver las diferencias entre grupos y sexos. En el caso del cortisol se hizo lo mismo. A continuación se compararon los grupos de uno y otro sexo entre sí. Los resultados, expresados en cifras medias y error standard de la media, se encuentran representados en las figuras numeradas del 15 al 24.

I. Estudio comparativo de FSH

En la figura 15 se muestran a la izquierda los resultados obtenidos en los cuatro grupos del sexo masculino, y a la derecha los resultados de los grupos del sexo femenino.

Ia) Grupos de Varones. - No hay diferencias significativas de los valores

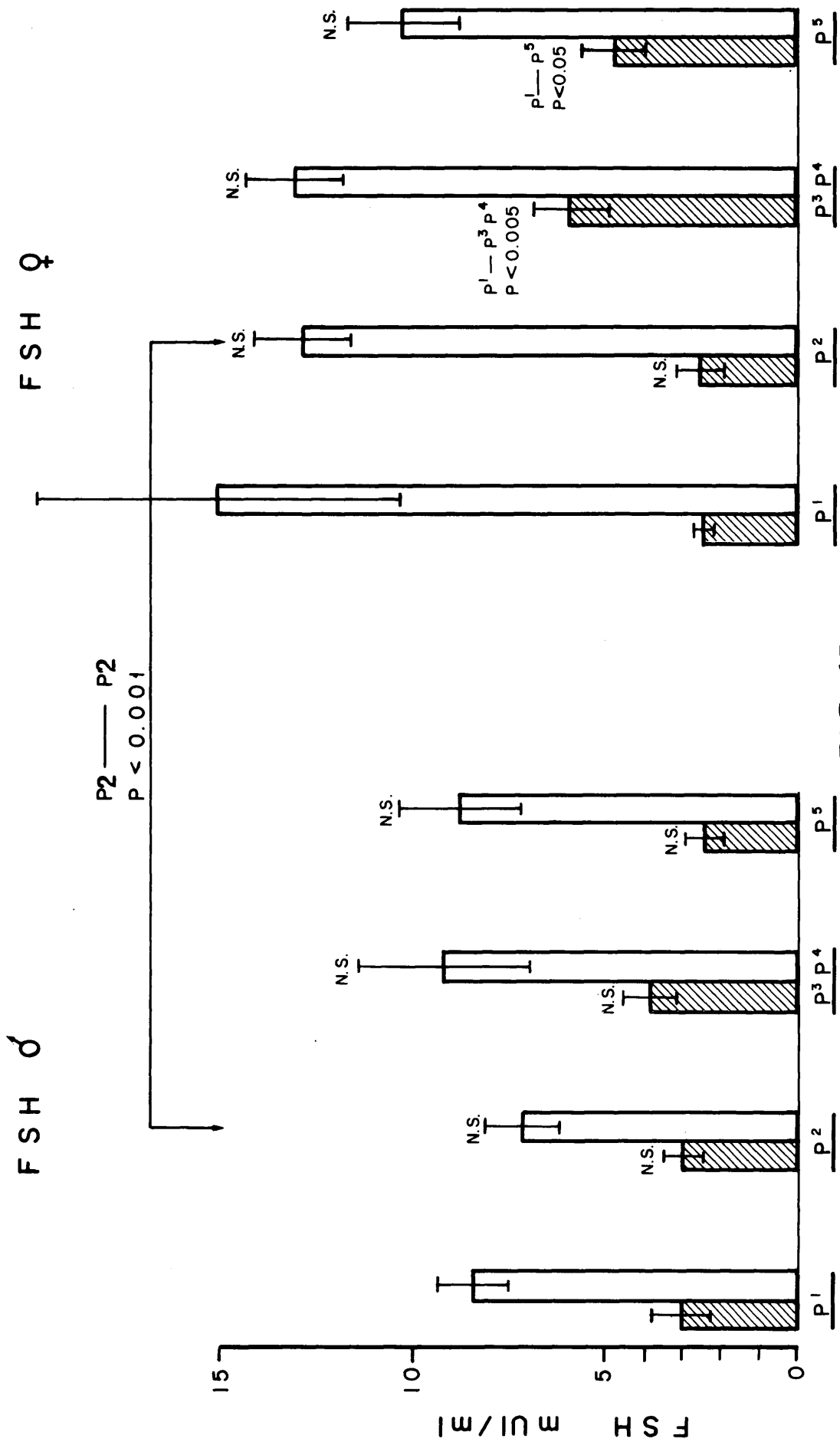


FIG. 15

COLUMNAS SOMBRADAS: valores basales
COLUMNAS EN BLANCO: valor de la respuesta

basales entre los grupos P2, P3-P4, F5, comparados con el grupo P1, que tampoco difieren entre si. En las respuestas tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos.

Ib) Grupos de Hembras, - Los valores basales de FSH en el grupo P2 no difieren de los del grupo P1, pero fueron significativamente mayores en el grupo P3-P4 cuando se le comparó con el grupo P1, con una diferencia estadística de $P < 0.005$. También fueron mayores los valores basales de FSH en el grupo P5 respecto al grupo P1 ($P < 0.05$), aunque no fueron diferentes entre si. Cuando se comparó la respuesta al estímulo entre estos grupos no se hallaron entre ellos diferencias significativas.

Ic) Comparación entre Grupos de Ambos Sexos. - No se observaron diferencias significativas de los valores basales de FSH entre uno y otro sexo. Aunque en el grupo P1 femenino los valores de FSH tras el estímulo alcanzaron cifras medias con márgenes de variabilidad muy amplios, debido a que algunas niñas en este grupo alcanzaron las respuestas más altas de todos los grupos, no hay diferencias significativas entre la respuesta de este grupo y el mismo grupo del sexo masculino. En el grupo P2, sin embargo, las respuestas de FSH sí fueron significativamente mayores ($P < 0.001$) en las hembras que en los varones.

II. Estudio comparativo de LH

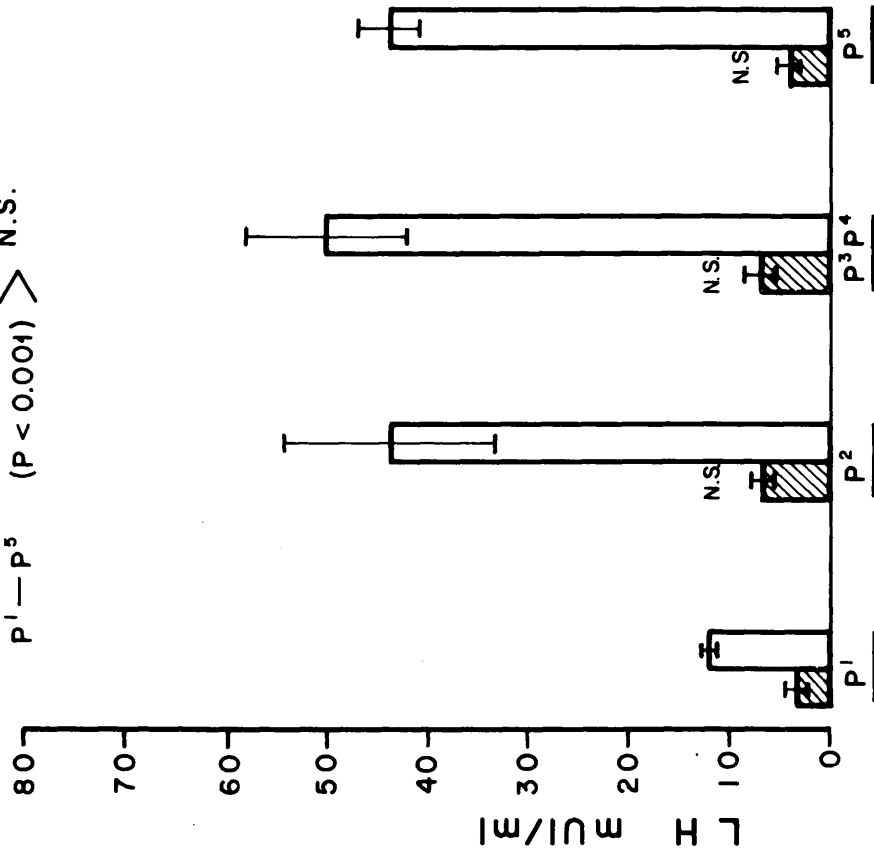
En la figura 16 se muestran, a la izquierda los resultados obtenidos al comparar los cuatro grupos de sujetos del sexo masculino, a la derecha los resultados en los grupos del sexo femenino.

- IIa) Grupos de Varones. - No se observan diferencias significativas en las cifras basales de LH entre grupos. La respuesta de los grupos P2, P3-P4 y P5 fueron significativamente mayores que en el grupo P1. La diferencia entre el grupo P2 y P1 fue significativa ($P < 0.02$), entre los grupos P3-P4 y P5 respecto al grupo P1 fue muy significativa en ambos ($P < 0.005$ y $P < 0.001$ respectivamente). Pero no se hallaron diferencias en las respuestas de LH entre estos últimos grupos entre si.
- IIb) Grupos de Hembras. - Los valores basales de LH entre estos grupos no fueron significativamente diferentes entre si. En cuanto a las respuestas, se vió que en los grupos P2, P3-P4 y P5, éstas fueron significativamente mayores que las del grupo P1. La diferencia entre P1 y P2 fue muy significativa ($P < 0.005$), entre P3-P4 y P1 muy significativa ($P < 0.001$) y también entre P5 y P1 ($P < 0.001$). Al comparar estos tres grupos entre si se encontró que la respuesta en P3-P4 es significativamente mayor que en P2 ($P < 0.001$). P5 no difiere de P3-P4.
- IIc) Comparación entre Grupos de Ambos Sexos. - En la figura 17 se encuentran representadas las diferencias encontradas en la respuesta de LH

LH ♂

MAXIMA RESPUESTA ENTRE GRUPOS:

P¹—P² (P < 0.02) > N.S.
 P¹—P³P⁴ (P < 0.005) > N.S.
 P¹—P⁵ (P < 0.001) > N.S.



COLUMNAS SOMBRADAS: valores basales
 COLUMNAS EN BLANCO: valor de la respuesta

LH ♀

MAXIMA RESPUESTA ENTRE GRUPOS:

P¹—P² (P < 0.005) > P < 0.001
 P¹—P³P⁴ (P < 0.001) > N.S.
 P¹—P⁵ (P < 0.001) > N.S.

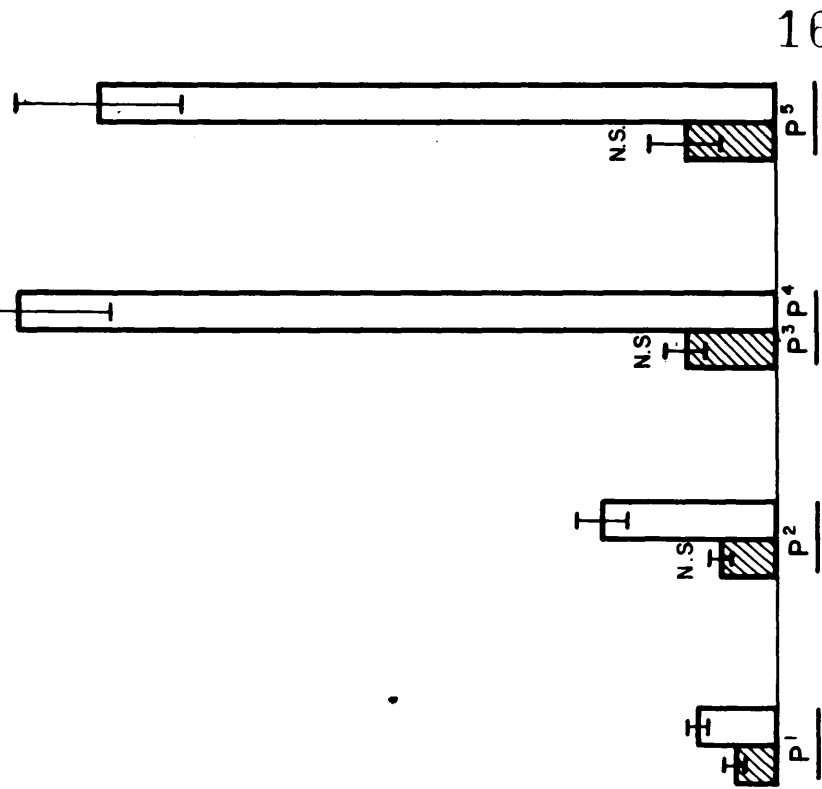


FIG. 16

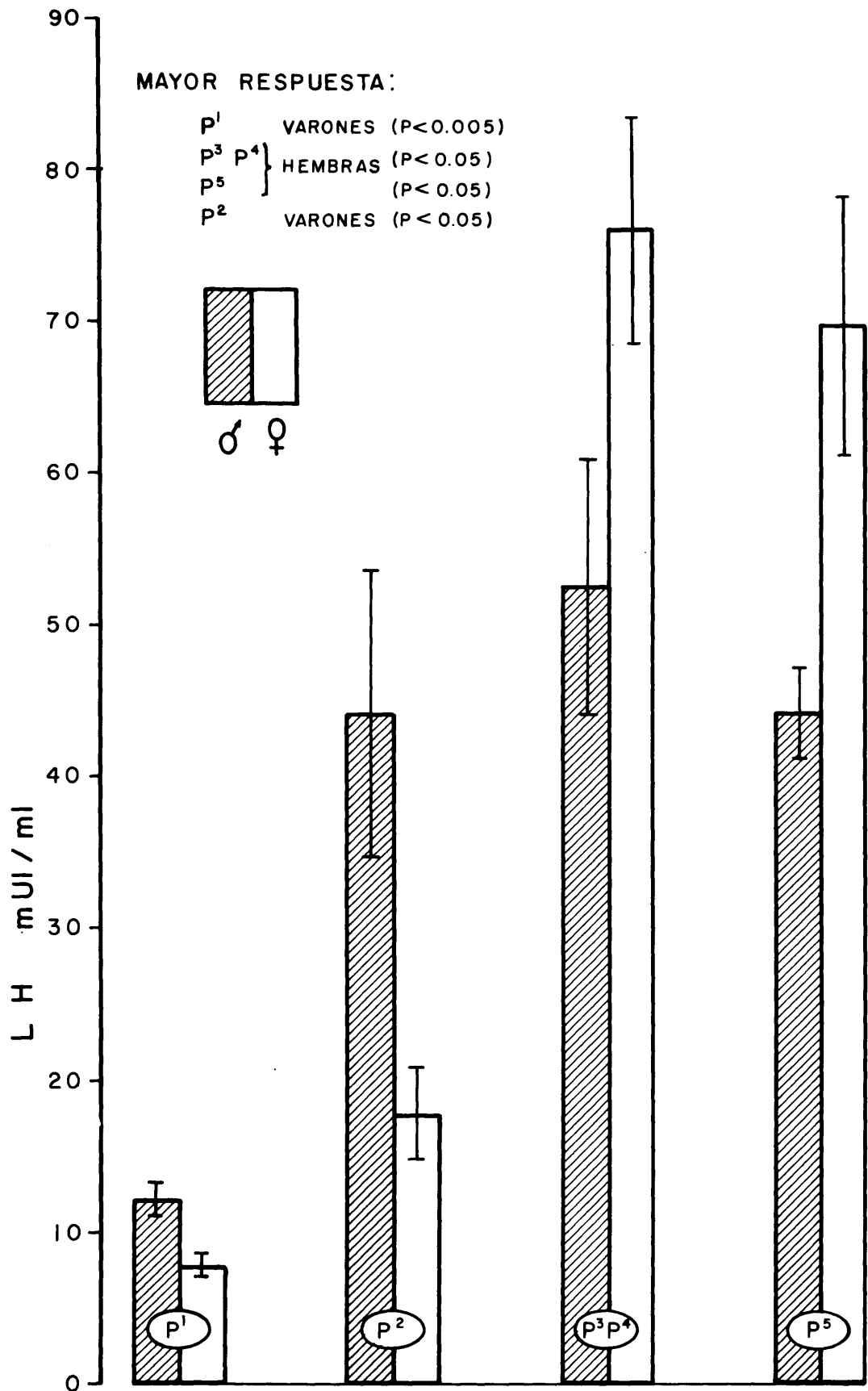


FIG. 17

entre uno y otro sexo. En los valores basales medios no se observan diferencias significativas de LH entre uno y otro sexo. Las respuestas de LH al estímulo fueron:

- entre los grupos F1: mayores en los sujetos del sexo masculino que en los del sexo femenino ($F < 0.005$)
- entre los grupos F3-F4 y F5: mayores en los sujetos del sexo femenino. La diferencia de la respuesta de LH entre los grupos P3-F4 femenino y masculino fue significativa ($F < 0.05$), y la respuesta entre los grupos F5 masculino y femenino fue también significativa ($F < 0.05$)
- entre los grupos F2: hubieron diferencias significativas, mayores en niños ($F < 0.05$) que en niñas.

III. Estudio comparativo de FRL

Los resultados de comparar los valores basales y los valores de máximo incremento tras el estímulo, entre grupos y entre sexos, referentes a la FRL se hallan representados en la figura 18.

- IIIa) Grupos de Varones. - Entre los grupos de sujetos del sexo masculino no se encontraron diferencias estadísticas significativas ni en los valores basales ni en la respuesta al estímulo combinado.

PRL ♂

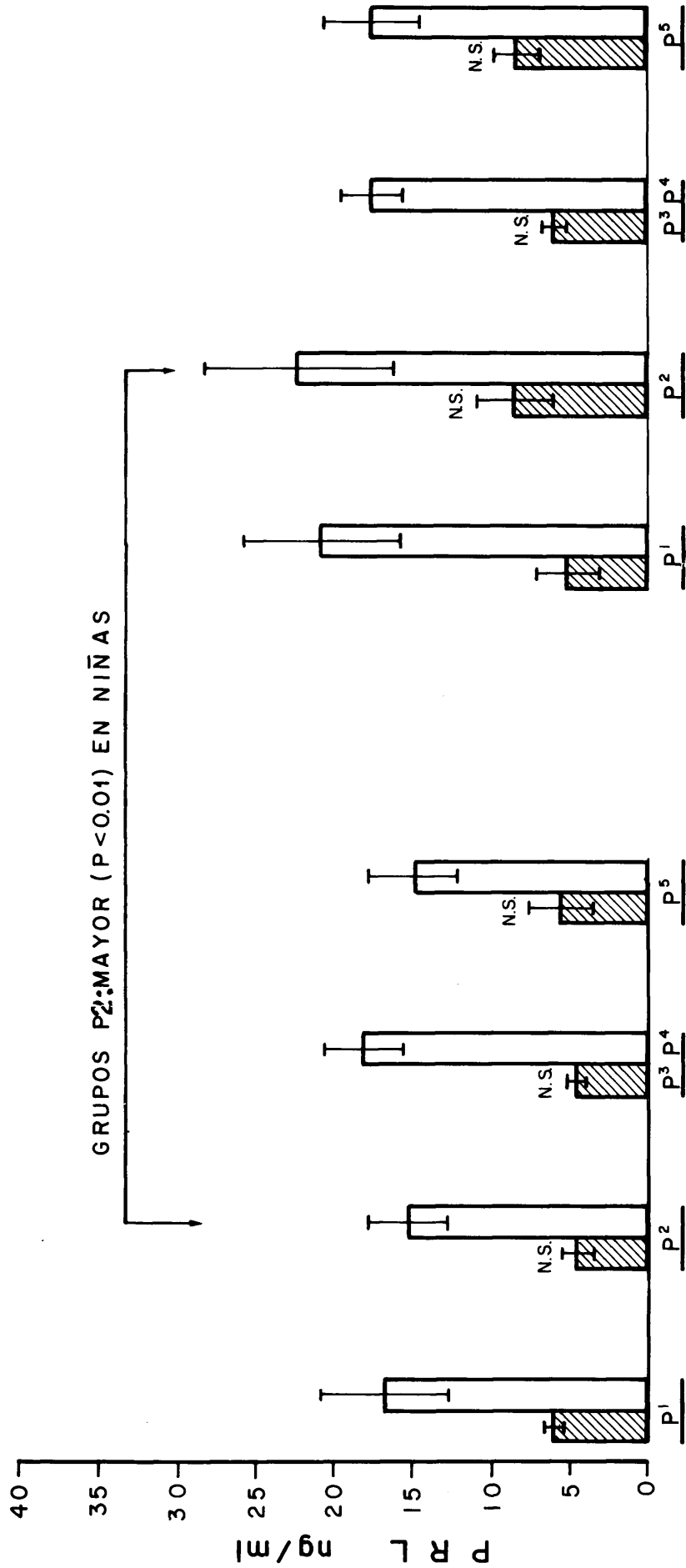
RESPUESTA:

$P^1 - P^2$
 $P^1 - P^3 P^4$ } N.S.
 $P^1 - P^5$

PRL ♀

RESPUESTA:

$P^1 - P^2$
 $P^1 - P^3 P^4$ } N.S.
 $P^1 - P^5$



COLUMNAS SOMBRADAS: valores basales
 COLUMNAS EN BLANCO: valor de la respuesta

FIG. 18

- IIIb) Grupos de Hembras, - Tampoco fueron significativamente diferentes ambos valores, basales y de máximo incremento, entre los diferentes grupos del sexo femenino.
- IIIc) Comparación entre Grupos de Ambos Sexos. - La respuesta de PRL fue mayor en las hembras del grupo P2 que en los varones del mismo grupo ($P < 0.01$). Es de señalar que esta fue la única diferencia significativa encontrada entre sujetos del sexo masculino y femenino y entre grupos de uno y otro sexo respecto a la PRL.

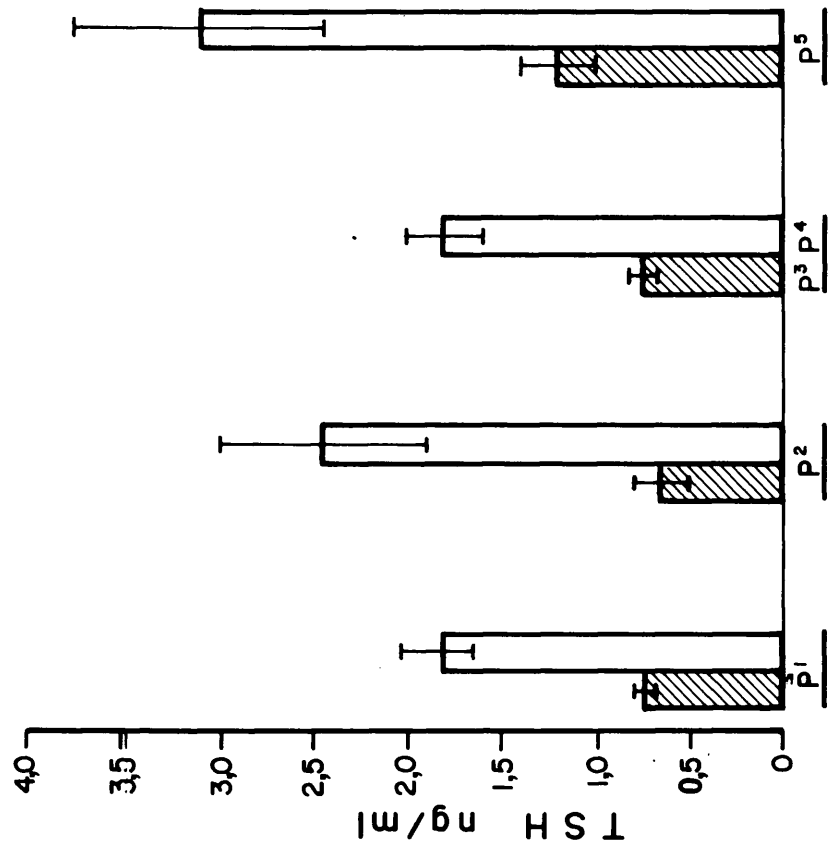
IV. Estudio comparativo de TSH

En la figura 19 se encuentran representados gráficamente los resultados al someter a comparación estadística los valores de TSH. Los varones a la izquierda, las hembras a la derecha.

- IVa) Grupos de Varones. - No se observan diferencias significativas ni entre los valores basales ni entre los valores plasmáticos de TSH tras el estímulo en los grupos de sujetos del sexo masculino.
- IVb) Grupos de Hembras. - Los valores basales de TSH en los grupos de hembras no difieren entre si. Pero la respuesta del grupo F3-F4 fue significativamente mayor, comparada con la respuesta del grupo P1 ($P < 0.02$).
- IVc) Comparación entre Grupos de Ambos Sexos. - Ni entre los valores ba-

TSH ♂

BASALES: N.S.
MAXIMAS: N.S.



COLUMNAS SOMBRREADAS: valores basales
COLUMNAS EN BLANCO: valor de la respuesta

TSH ♀

BASALES: N.S.
RESPUESTAS: P¹ — P³P⁴ (P < 0.02)

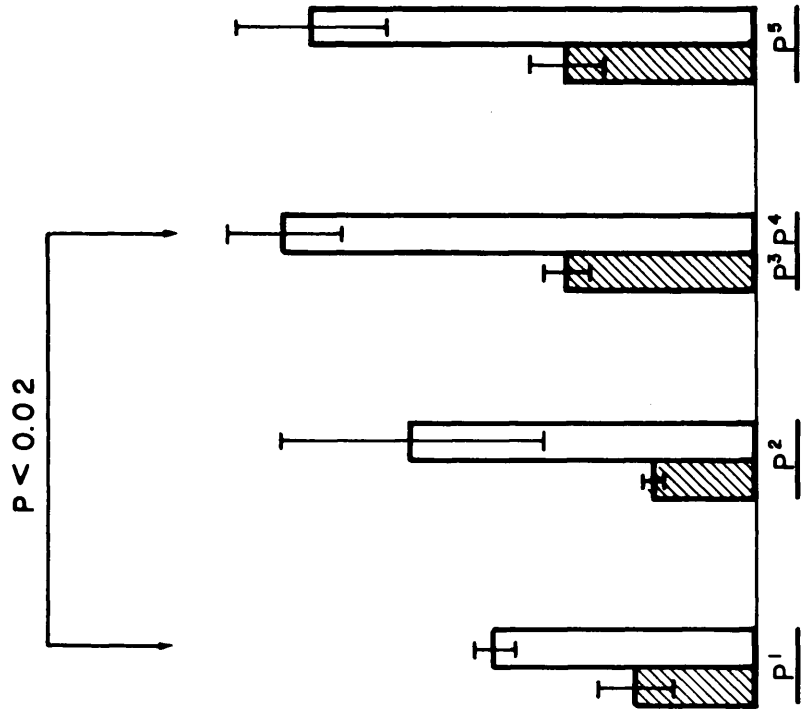


FIG. 19

sales ni entre los valores correspondientes a los picos de respuesta máxima se encuentran diferencias significativas de TSH entre los dos sexos.

V. Estudio comparativo de HGH

En la figura 20 se encuentran representados los resultados de comparar los valores basales y de máxima respuesta tras el estímulo de HGH, entre los grupos del sexo masculino a la izquierda, femenino a la derecha, y las diferencias entre los sexos.

- Va) Grupos de Varones. - Las cifras basales de HGH no fueron significativamente diferentes entre estos grupos. En cuanto a las respuestas la única diferencia que se encontró fue que en el grupo P5 esta fue significativamente mayor que en el grupo P1 ($P < 0.02$).
- Vb) Grupos de Hembras. - Entre las niñas, las cifras basales de HGH no difieren entre si. Comparadas las respuestas del grupo P1 y F2, se ve que la del grupo P2 es mayor ($P < 0.02$) que la del grupo P1. También son mayores las respuestas de los grupos P3-F4 y P5 respecto a la del grupo P1. Se encontraron diferencias significativas, entre P3-P4 y P1 de $P < 0.05$, y entre P5 y P1 de $P < 0.02$. Pero no difieren entre si.
- Vc) Comparación entre Grupos de Ambos Sexos. - Ni entre los valores ba-

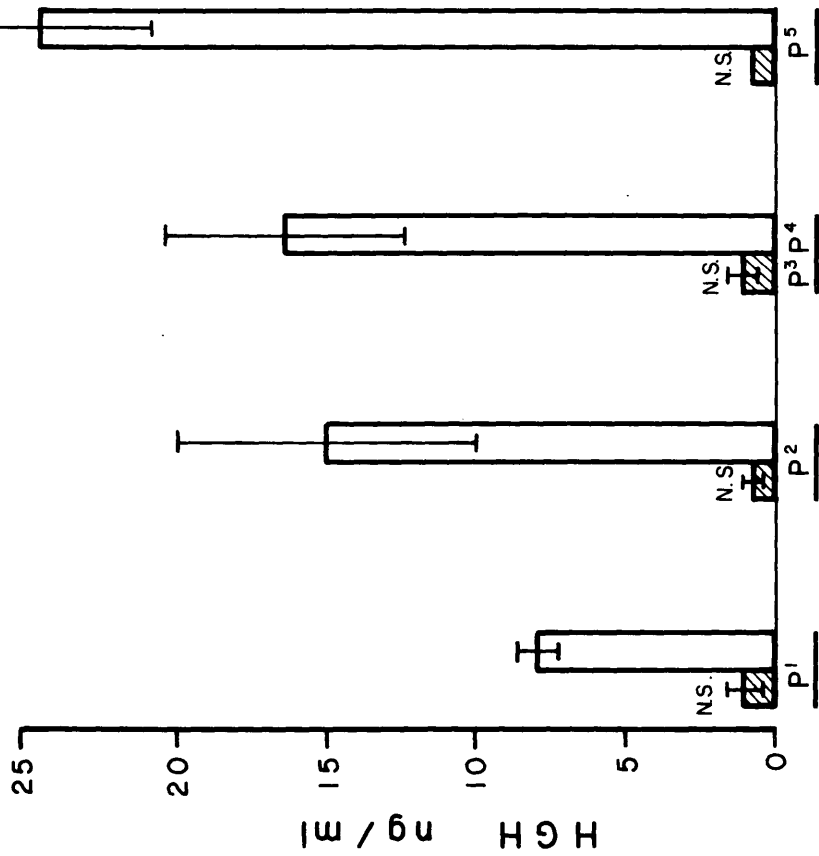
HGH ♂

RESPUESTAS:

P¹-P² (N.S.)

P¹-P³ P⁴ (N.S.)

P¹-P⁵ (P<0.02)



COLUMNAS SOMBRADAS: valores basales
 COLUMNAS EN BLANCO: valor de la respuesta

HGH ♀

RESPUESTAS:

P¹-P² (P<0.02)

P¹-P³ P⁴ (P<0.05)

P¹-P⁵ (P<0.02)

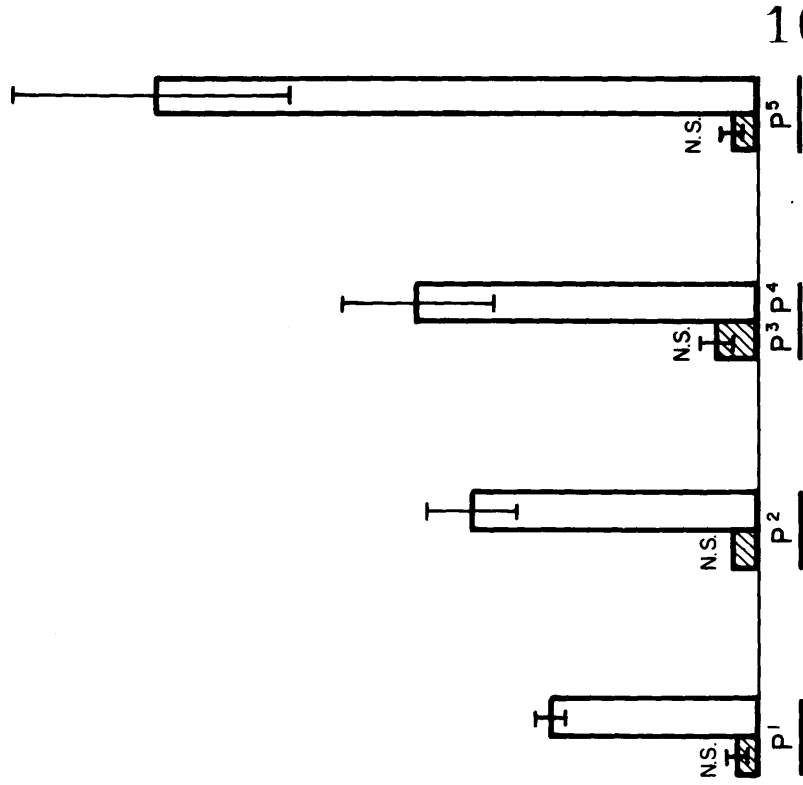


FIG. 20

sales de HGH ni entre las respuestas hubieron diferencias significativas entre sexos.

VI. Estudio comparativo del CORTISOL

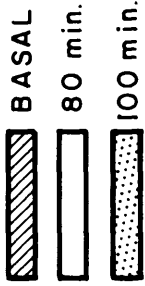
En las figuras 21 y 22 se muestran los resultados de comparar las cifras basales de cortisol, los valores a los 80 minutos y también a los 100 minutos, entre grupos de uno y otro sexo.

VIa) Grupos de Varones. - En la figura 21, se muestra que no hay diferencias significativas en los valores basales de cortisol entre los cuatro grupos de sujetos del sexo masculino, y que la respuesta en el grupo P5 es la menor de todos ($P < 0.05$), sin diferencias significativas de los valores entre los grupos a los 100 minutos.

VIb) Grupos de Hembras. - Los valores basales de cortisol difieren entre el grupo P1 (donde están más elevados) y el grupo P2 ($P < 0.005$). También resultaron más elevados en el grupo P1 que en el grupo P3-P4 ($P < 0.05$), pero no difieren de los valores basales del grupo P5. La respuesta a la acción hipoglucemiante de la insulina se vió que fue mayor en el grupo P1 que en grupo P2 ($P < 0.05$), y también que en el grupo P3-P4 ($P < 0.005$), pero sin diferencias con P5.

En cuanto a las diferencias entre grupos, en el último tiempo de la prueba, se ve que en el grupo P1 el cortisol está más elevado signifi-

CORTISOL ♂



BASALES, N.S.

RESP., N.S.

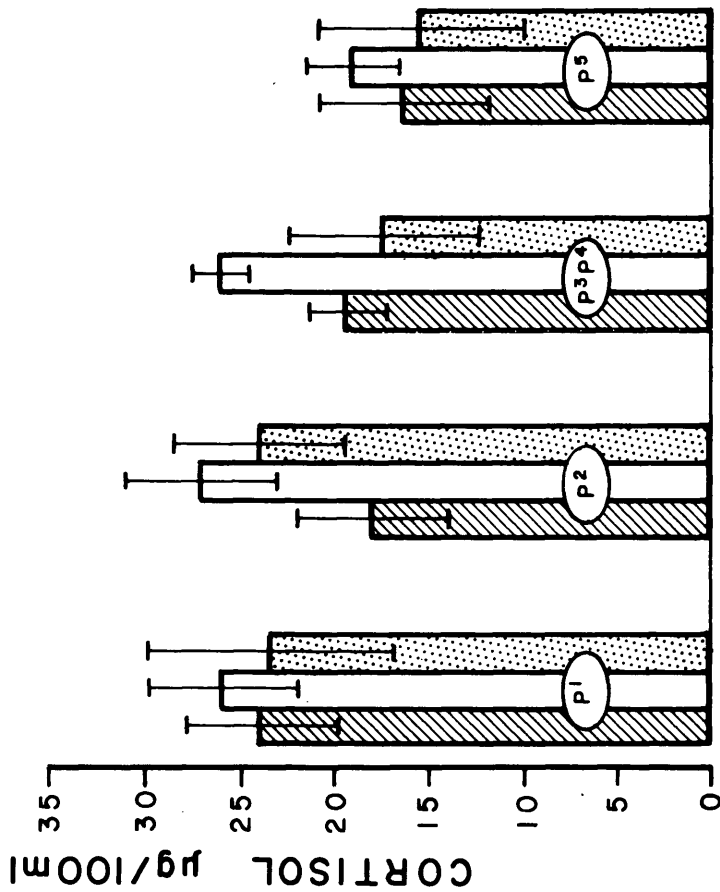


FIG. 21

CORTISOL ♀

BASALES:

†P¹ - P² (P < 0.05)
 †P¹ - P³P⁴ (P < 0.05)
 P¹ - P⁵ N.S.

RESPUESTAS:

†P¹ - P² (P < 0.05)
 †P¹ - P³P⁴ (P < 0.005)
 P¹ - P⁵ N.S.

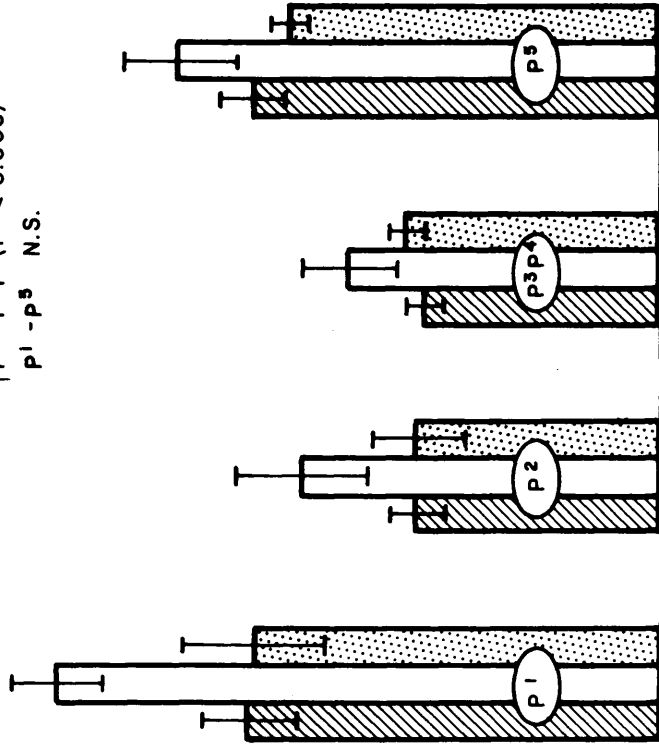


FIG. 22

cativamente ($P < 0.05$) que en P2. Es mayor también con diferencia muy significativa ($P < 0.005$) en P3-P4, que en P1. Entre P1 y P5 no hay diferencias significativas.

VIc) Comparación entre los Grupos de Ambos Sexos. - La similitud de los valores basales de respuesta a la hipoglucemia y de recuperación a los 100 minutos fueron tan semejantes entre hembras y varones que no se creyó necesario hacer el estudio estadístico comparativo entre los mismos.

VII. Estudio comparativo de la GLUCEMIA

En la figura 23 se representan las diferencias de valores de glucemia entre los grupos de sujetos del sexo masculino y basales, tras el estímulo y a los 60 minutos. En la figura 23, los resultados en el sexo femenino.

VIIa) Grupos de Varones. - Los valores basales entre estos grupos no difieren entre sí. La hipoglucemia no fue estadísticamente diferente en los grupos P2 y P3-P4 cuando se compararon con el grupo P1, pero entre el grupo P5 y P1 sí se hallaron diferencias significativas ($P < 0.05$).

No hay diferencia de los valores entre los grupos, a los 60 minutos.

VIIb) Grupos de Hembras. - No se encuentran diferencias significativas entre los valores basales de los cuatro grupos. La respuesta hipoglucémica

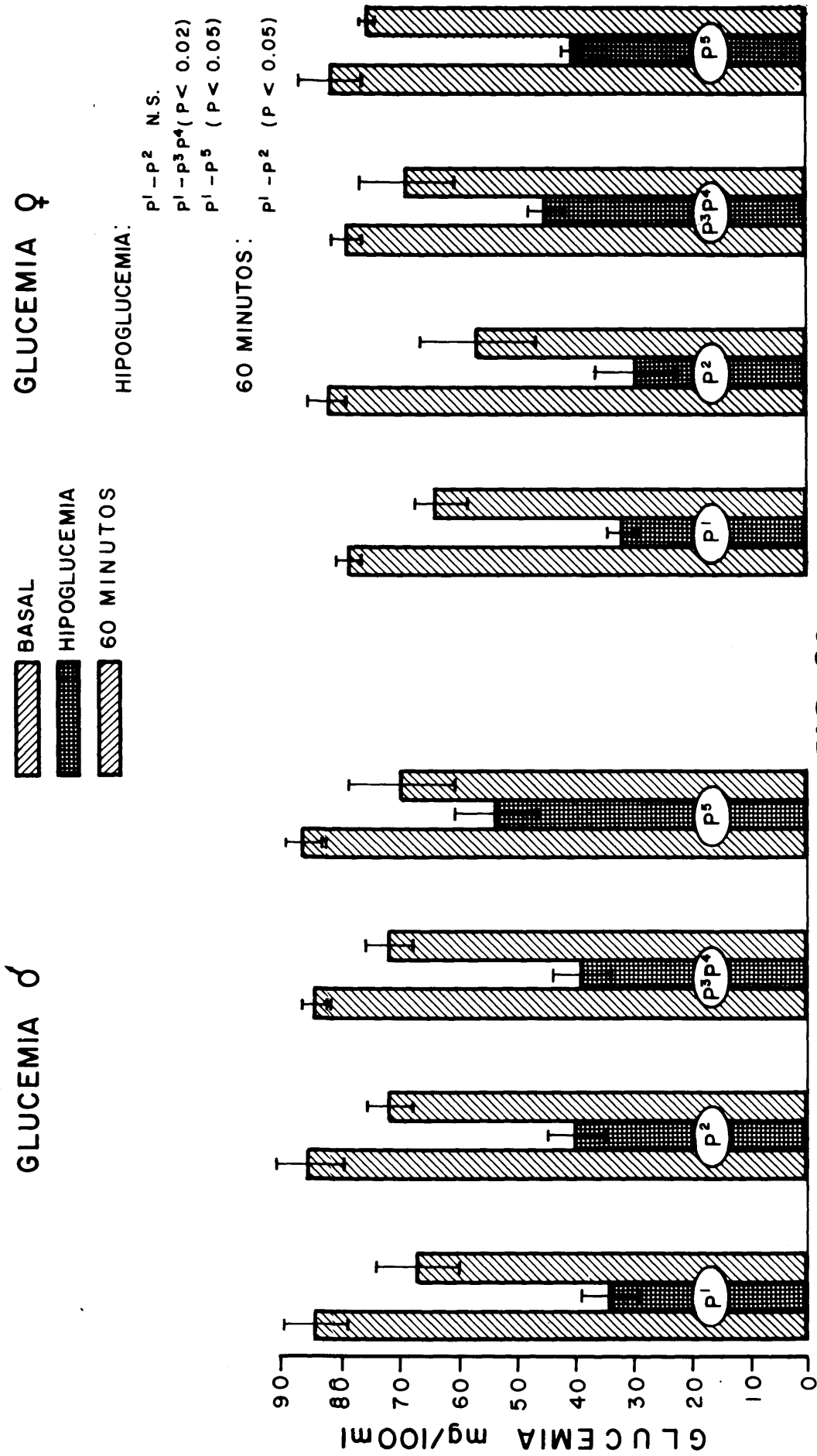


FIG. 23

fue menor en los grupos P1 y P2 --sin diferencias significativas entre si-- que en el grupo P3--P4 ($P < 0.02$), y que en el grupo P5 ($F < 0.05$). Al final de la prueba, en las niñas en el grupo P5 la glucemia está más elevada significativamente ($P < 0.05$) que en el grupo P1.

VIIc) Comparación entre Grupos. - Las cifras basales de ambos sexos son semejantes y no se sometieron a estudio estadístico. Las cifras de hipoglucemia no guardan diferencias significativas entre los grupos de uno u otros sexo, y los valores a los 60 minutos tampoco difieren entre los grupos de uno y otro sexo.

DISCUSSION

En vista de los resultados obtenidos en el presente estudio se puede afirmar que la administración del decapeptido sintético LHRH ha inducido la rápida liberación de las reservas hipofisarias de gonadotropinas en todos los sujetos estudiados, que el tripéptido TRH ha actuado sobre la liberación de TSH y PRL, y que la hipoglucemia inducida por insulina ha dado lugar a un aumento de los niveles circulantes de HGH, de acuerdo con la acción específica conocida de dichos estímulos y coincidiendo con los datos publicados por Rakoff y cols., Mortimer y cols., Hervás y cols. (en prensa) y otros.

Sin embargo, no en todos los sujetos se ha comprobado el aumento que era de esperar en los niveles del cortisol como índice de la liberación de ACTH producido por la hipoglucemia insulínica. Tanto Cacciari (1975) como otros, han sugerido que el aumento del cortisol depende tanto de la intensidad de la hipoglucemia obtenida como de que esta se mantenga durante cierto tiempo. Este resultado se señala con el objeto de que sea valorado de cara a pruebas futuras con el mismo estímulo.

A. Gonadotropinas (FSH y LH)

1. Al valorar los resultados obtenidos con las gonadotropinas se ve que

los valores basales no difieren en el sexo masculino. En hembras, FSH mayores en grupos F3-F4 y F5 que en F1, observación que coincide con algunas encontradas en la literatura. Schönberg (1976) cita que en niñas, la reacción de FSH al estímulo LHRH es menos acentuada arrancando de niveles básicos muy elevados que la de LH.

2. Las respuestas han sido positivas en todos los sujetos, aun en prepúberes.

Desde que se conocen los primeros datos sobre pruebas de descarga hipofisaria de gonadotropinas debidos a Kastin, Gual y Schally (1972), Roth y cols. (1972), Job y cols. (1972) se sabe que también antes de la pubertad la hipófisis segrega y moviliza, como respuesta a LHRH, gonadotropinas detectables por radioinmunoanálisis. Esto hace que la prueba de LHRH sea útil para valorar el eje hipofisogonadal en niños con edad ósea debajo de los 10 años sin ningún signo de maduración sexual, padeciendo de trastornos del crecimiento aislado o asociado a otras deficiencias hipofisarias, al contrario de lo que sucede según autores con el clomifeno, que no estimula la liberación de gonadotropinas en prepúberes por falta de maduración hipotalámica.

3. La respuesta de FSH fue mayor en algunas niñas del grupo de prepúberes que en los niños del mismo grupo. La respuesta en algunas fue muy elevada, aunque estadísticamente la media del grupo no difiere entre los sexos debido al amplio margen de variabilidad de la respuesta en las niñas. Sin embargo sobrepasa la respuesta a la del gru-

po de adultas, como se puede observar en la gráfica nº 1.

Esta diferencia entre los sexos propia de esta edad ha sido señalada por Winter y cols. (1972, 1976) quienes estudian los esteroides gonadales y las gonadotropinas en niños durante la vida fetal, en los primeros meses después del nacimiento y a través de la infancia, notan, desde los primeros meses de la vida embrionaria diferencias en cuanto a la secreción de gonadotropinas, testosterona y estrógenos entre ambos sexos.

Destacan el aumento de testosterona en varones durante la etapa fetal, coincidiendo con la diferenciación sexual, gonadal e hipotalámica en esta época. En la niña a los 4 meses de nacida encuentran cifras altas y variables de FSH que coincide con gran actividad ovárica observada por algunos en esa época, encontrando que también la LH está más elevada que en los varones. Además observan que los valores de FSH permanecen elevados por más tiempo en niñas que en varones generalmente hasta después de los 4 años, demostrando una demora en establecerse los mecanismos de retroacción negativos que, mediados por los estrógenos controlan la secreción de gonadotropinas. Piensan que este hecho sería la causa de la telarquia prematura transitoria de algunas niñas en esta edad. Esta diferencia entre los sexos, notable en la vida fetal y que se manifiesta durante la infancia, vuelve a producirse en la pubertad.

La respuesta de FSH, mayor entre niñas prepúberes, ha sido señalada previamente por Kelch y cols. (1957), Roth y cols. (1973) Garnier y

cols. (1974) Guadalix y cols. (1974) y otros.

4. En las figuras que ilustran las respuestas de LH y FSH en ambos sexos, se puede observar que la FSH no aumenta con el comienzo de la pubertad mientras que la respuesta de LH es significativamente más elevada en los grupos F^2 de ambos sexos. Esta diferencia observada por Roth y cols. (1972), Kelch y cols. (1957) entre otros, tiene importancia clínica cuando se trata de valorar el estado de maduración hipotalámica en el diagnóstico diferencial entre pubertad precoz verdadera y falsa pubertad precoz, así como para valorar el estado de maduración hipotalámica en niños con hipogonadismo hipogonadotrópico hipotalámico.

Reiter y cols. (1975) hallan respuesta puberal, en la pubertad precoz. Zárate y cols. (1972), Chaussain y cols. (1972) y otros ven que las respuestas prepuberales al estímulo, permiten confirmar el diagnóstico clínico de hipogonadismo hipogonadotrópico hipotalámico. En los casos de pubarquia precoz una respuesta prepuberal indicaría la falta de maduración del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal y que la pubarquia podría ser debida más bien a maduración precoz del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal. Inclinando el diagnóstico en este sentido, permitiría investigar la posible etiología suprarrenal del problema.

Esta diferencia en la acción del estímulo aplicado sobre gonadotropinas entre adultos y prepúberes pudiera explicarse teniendo en cuenta la teoría de acción retrógrada de la inhibina para FSH.

Se ha demostrado que los extractos germinales de toro y humano inhiben el aumento de LH tras la castración. En adultos se ve que en casos de lesiones testiculares primitivas los índices de FSH están elevados mientras que los de LH no se elevan notablemente. En la mujer menopáusica FSH se halla muy elevada cuando los índices de estrógenos y de LH permanecen normales. Estos hallazgos sugieren que hay un control retrógrado distinto para LH y FSH, pudiendo ser la substancia que se ha denominado inhibina la responsable de este efecto de control retrógrado sobre FSH.

Si la inhibina existe --como parece estar demostrado-- en las células de Sertoli en el hombre y en el líquido folicular de la mujer teniendo un papel importante en el control retrógrado de FSH se piensa que los resultados de la prueba de LHRH pudieran estar mediatizados por la misma, dando lugar a respuesta de LH predominante en el adulto y respuesta más acusada de FSH en los prepúberes, en los que aún no se ha comenzado a sintetizar la inhibina.

5. La respuesta de LH en niñas (en los grupos P3-P4), cuando aun no tenían la menarquia pero con un desarrollo sexual avanzado, está tan elevada como la respuesta del grupo con menarquia. Considerando que en la mujer el comportamiento sexual es cíclico, y está condicionado por el aumento de estrógenos y la acción de retracción positiva que este aumento ejerce sobre el centro cíclico hipotalámico, esta observa-

ción sería consistente como signo significativo de que el aumento de estrógenos en esta época está ejerciendo su efecto retrógrado positivo aumentando la secreción de LH, y no de FSH que estaría inhibida, bien por efecto de la acción negativa de estrógenos sobre FSH o por efecto de la inhibina. La caída de los estrógenos daría lugar a que, por privación estrogénica, se produjera la primera menstruación, bajando LH y subiendo FSH para comenzar los ciclos.

6. En este estudio la diferencia de la respuesta de LH entre sexos ha sido variable. En los grupos P1, P2 fue mayor en los varones, y en los grupos P3-F4 y P5 fue mayor en las hembras. Las niñas del grupo P5, después de la menarquia, tienen pues, en la fase folicular temprana del ciclo, mayores cifras de LH que los varones del mismo grupo, y esto ha dado lugar a que se revise la literatura respecto a la diferencia entre sexos en adultos, encontrándose discrepancias: Vaitukaitis y cols. y Abraham y cols., citados por Schalch y cols. (1972), muestran que en los hombres normales en edad reproductiva las respuestas al estímulo sintético LHRH son mayores que en las mujeres en la fase folicular del ciclo. Rakoff y cols. (1974), con el estímulo combinado de arginina, LHRH y TRH, también en adultos, encuentran mayores las respuestas de LH en hombres que en mujeres. Otros no encuentran diferencia alguna entre los sexos, a menos que la respuesta considerada sea la que se produce en la fase ovulatoria femenina, que es la mayor de todas.

3. Prolactina (FRL)

1. Se observa en este estudio que los valores basales de PRL son semejantes en todos los sujetos estudiados, sin diferencias debidas al sexo o al grado de desarrollo puberal. Este hallazgo coincide con resultados publicados.

Demostrado por Knoff y cols. (1962) que los estrógenos en ratas no sólo modulan la secreción de HGH sino también la de PRL, comenzaron los estudios para comprobar este efecto en humanos. Friesen y cols. (1972) y Lee y cols. (1974) no encuentran que los valores basales de gonadotropinas varien con la edad ni con el sexo. Estos últimos estudian en varones los niveles basales de FRL además de testosterona y gonadotropinas, a través de los estadios puberales y no encuentran cambios en esta hormona, lo cual contrastó con la subida de LH y FSH en pubertad avanzada. Aubert y cols. (1974) tampoco encuentran diferencias en las niñas estudiadas en iguales circunstancias, entre 7 y 17 años de edad.

Noel y cols. (1972) no encuentran diferencias entre los adultos de ambos sexos y Jacobs y cols. (1974) publican que se encuentra más elevada en el sexo femenino. Por lo que se ve la discrepancia existente en cuanto diferencias entre sexos y PRL.

2. En este estudio se ve que el estímulo utilizado para liberar las re-

servas de prolactina hipofisaria ha dado lugar a un aumento de las concentraciones séricas de las mismas que no difieren según el avance o desarrollo puberal de los individuos, pero sí se ve una diferencia entre los sexos ya que en los sujetos del grupo con pubertad incipiente, P2 la respuesta es mayor significativamente en las niñas.

Rakoff y cols. utilizando la prueba múltiple a la que se ha hecho referencia al principio de este trabajo concluyen que la prolactina respondió más en mujeres que en hombres adultos.

En vista de los resultados hallados en el grupo P2 del sexo femenino el cual se caracteriza por encontrarse en los comienzos de su desarrollo puberal, se considera de interés indagar sobre los trabajos publicados en relación con la posible influencia de PRL en los mecanismos de desarrollo puberal.

Entre los trabajos publicados se encuentran los de Wuttke y cols, (1975) en ratas hembras. Ellos observan que antes de los 21 días de nacidas, los valores de PRL son bajos, en ambos sexos, aumentan primero en las hembras y se mantienen altos después de adultas. Sugieren que existe una interacción entre gonadotropinas, FRL y esteroides gona- dales relacionada con el desencadenamiento de la pubertad en ratas emitiendo la hipótesis de que esta interacción hormonal regularía el desarrollo puberal.

Por otra parte se encuentran las observaciones relacionadas con el papel de PRL en el ciclo menstrual y sus alteraciones: la hiperprolactinemia no solo se asocia a veces a galactorrea sino que se ve relacionada con ciclos anovulatorios, trastornos menstruales y fases luteínicas cortas. Este efecto lo explican Besser y cols., considerando que la PRL interfiere la acción de las gonadotropinas a nivel de las células gonadales alterando la producción de los estrógenos lo cual da lugar a un aumento de FSH. Este descenso de los estrógenos impide a nivel del hipotálamo el efecto de retroacción positiva de los mismos y desciende LH.

Observando los resultados del estímulo en el grupo P2, se ve que la respuesta de FSH al mismo fue mayor en las niñas que en los varones; los valores de la respuesta de LH son menores que en varones --mientras que en los grupos P3-4 y 5 fue mayor en las hembras-- y fue el único grupo con valores de PRL que difieren significativamente.

Estas coincidencias en el mismo grupo pudieran explicarse porque PRL elevada actuando sobre las células productoras de estrógenos limitaría su producción lo cual daría lugar a aumento de FSH que en efecto se ve más elevada en este grupo, y limitaría la reserva de LH movilizable por el estímulo. También se debe a Besser la sugerencia de que la producción elevada de PRL podría interferir en la acción de LHRH endógeno sobre las células de la hipófisis.

C. Tirotropina (TSH)

1. En este estudio no se han observado diferencias en las concentraciones basales de TSH en los distintos grupos de un mismo sexo, ni entre ambos sexos.

2. Se ha comprobado que la respuesta tras el estímulo fue positiva y significativa en todos los sujetos estudiados. Esta respuesta no fue distinta entre los varones, pero en el sexo femenino fue significativamente mayor en el grupo P3-P4 que en el P1, siendo el único grupo en el cual se apreció una posible influencia de los estrógenos sobre la respuesta de TSH, como había sido observado ya por Schalch y cols. (1972) y por Schally, Gómez Pan y otros.

Este efecto no se ve, sin embargo, en el grupo de niñas con menarquia establecida, y pudiera explicarse por la tasa baja de estrógenos propia de la fase folicular temprana del ciclo en la que se realizó la prueba en estos sujetos.

D. Hormona de Crecimiento (HGH)

1. En cuanto a la secreción de HGH en este estudio se ha observado que las cifras basales de la hormona no difieren entre los sujetos estudiados.

2. Pero la respuesta al estímulo ha sido positiva y significativa en

todos siempre con algunas variaciones entre los grupos, aunque sin diferencias entre los sexos.

3. La respuesta fue mayor en el grupo P5 que en el P1, entre los varones. Aunque Martin y Clark (1968) observaron que la testosterona aumenta la secreción de HGH en pacientes con hipogonadismo, Merimée y Fineberg (1971) no comprueban este efecto del andrógeno en hombres normales lo cual explicaría el aumento de HGH en este grupo.

4. En el sexo femenino se vió, que la respuesta de HGH fue mayor en los grupos P2, P3-P4 y P5 que en el P1. Es posible que esta diferencia refleje la acción de los estrógenos sobre la liberación de HGH. Frantz y Rabkin (1965) observaron que distintos estímulos capaces de inducir una liberación de HGH tenían un efecto más pronunciado en mujeres adultas que en hombres de la misma edad y lo atribuyeron a la acción de los estrógenos sobre la liberación de HGH. Roth y cols. (1963) y otros, no encontraron variaciones en las diferentes fases del ciclo en la secreción de HGH, tras hipoglucemia inducida por insulina. Sin embargo Merimée y Fineberg (1971) observan que con el mismo grado de intensidad de hipoglucemia inducido por insulina la diferencia entre sexos depende de la tasa de estrógenos circulantes en la mujer. Con una hipoglucemia determinada, la mujer respondía igual que el hombre si estaba en la fase menstrual del ciclo, pero con esa misma hipoglucemia respondía más que en el hombre si se hallaba en la fase

preovulatoria del mismo. Esto les permite sugerir que los estrógenos modulan la secreción de HGH en humanos y que una relación homeostática entre estas dos hormonas --estrógenos y HGH-- es necesaria en el ciclo, en relación con los fenómenos de la función reproductora. Esto podría explicar la diferencia encontrada entre las secreciones de HGH a través de las distintas etapas del desarrollo sexual en las niñas.

E. Cortisol

La respuesta al estímulo del Cortisol fue significativa en los grupos P3-P4 entre los varones y en los grupos P1 y P3-P4 en las hembras, pero no lo fue en los demás grupos. No se observan diferencias entre sexos ni hay diferencias entre la respuesta de unos y otros grupos en el sexo masculino.

Se nota que las cifras basales en niñas del grupo P1 son significativamente más altas que en los grupos P2 y P3-P4 y aparentemente sobrepasan las cifras normales dadas en este laboratorio para basales en adultos. Podrían ser el resultado del stress causado por la prueba en esa edad. Esto da lugar a que también las respuestas sean mayores en este grupo.

De conformidad con lo consultado en la literatura y de acuerdo con la muestra estudiada no es posible llegar a conclusiones sobre for-

ma del comportamiento de la respuesta. Según Landon y cols. (1963) la hipoglucemia inducida por insulina --definiéndose como hipoglucemia la caída de la glucosa a menos de 40 mg/100ml-- provoca aumento del cortisol de 2 a 2,5 veces de sus valores iniciales a los 30 minutos de la caída de la glucemia, y va precedido por aumento de ACTH. Cacciari y cols. (1975) obtienen resultados análogos en prepúberes. Sin embargo, Carrol y cols. (1969), Laron y cols. (1969) y Shenkin y cols. (1970), consideran respuesta subnormal cuando el aumento del cortisol es menor de 5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, o si el cortisol no sobrepasa 25 μg en ningún momento de la prueba. Aplicando estos criterios a los grupos estudiados, se ve que únicamente en F5 (varones) y F3-F4 (hembras) la respuesta puede ser considerada subnormal, pero, como consta en las Tablas XIII y XIV, son también los únicos grupos en los que la glucemia no descendió por debajo de 40 mg/100ml.

Por otra parte al valorar la respuesta ha de tenerse en cuenta: 1) Se ha demostrado que el stress aumenta el cortisol, y el miedo a la prueba, especialmente en niños, puede haber causado una descarga previa de ACTH. 2) El ritmo circadiano del cortisol se establece desde los tres años, y sus concentraciones son óptimas en las horas de la mañana, cuando se hace la prueba, lo que puede enmascarar los resultados. 3) Algunos autores (Voigt y cols. 1974), prefieren valorar la respuesta hipofisaria de ACTH mediante la administración de lisinavasopresina, que actúa directamente sobre la hipófisis anterior.

.....

CONCLUSIONES

Se ha estudiado una muestra de 48 sujetos, 26 del sexo masculino y 22 del sexo femenino, con edades comprendidas entre 7.2 - 15.2 años los del sexo femenino y 9.2 - 17.9 los del sexo masculino, seleccionados como normales por: a) la relación armónica entre su edad ponderal-estatural, ósea y sexual, con su edad cronológica; b) por encontrarse en buen estado de salud; y c) por no tener antecedentes de haber padecido enfermedad importante.

El objeto ha sido estudiar la respuesta de FSH, LH, PRL, TSH, HGH y ACTH --tomando los niveles de cortisol como índice de liberación de ACTH-- tras la administración intravenosa simultánea de LHRH, TRH e insulina durante la época de crecimiento y desarrollo sexual.

Se han dividido en grupos de acuerdo con el grado de desarrollo sexual, siguiendo la clasificación de Tanner, modificada, y se han designado los grupos como P1, P2, P3-P4 y P5, con una subdivisión de los mismos en masculinos y femeninos.

En los grupos P1 se han incluido los sujetos de ambos sexos sin signos manifiestos de pubertad; en los grupos P2, los que presentaban síntomas de pubertad incipiente; en los grupos P3-P4 aquellos con pubertad avanzada en menor o mayor grado; y en los grupos P5, las

niñas con menarquia establecida y los varones con signos de completo desarrollo testicular.

Del análisis estadístico de los resultados se han alcanzado las siguientes CONCLUSIONES:

- I. - En todos los sujetos de la muestra, aumentaron las concentraciones séricas de FSH, LH, FRL, TSH, HGH sobre el valor basal, como efecto de los estímulos sobre las reservas hipofisarias de las mismas. Sin embargo, no se puede asegurar la reserva hipofisaria de ACTH, demostrable por el aumento de cortisol sérico, porque a pesar de las disminuciones de glucosa a un 50% o más, por debajo de los valores basales en la mayoría de los casos, solamente en algunos grupos se muestra estadísticamente el aumento de cortisol que se esperaba. No se puede, pues, llegar a ninguna conclusión sobre la respuesta de ACTH.
- II. - En cuanto a las gonadotropinas, los valores basales de LH fueron semejantes en la totalidad de los sujetos estudiados, sin apreciables diferencias entre sexos y grados de desarrollo sexual. Sin embargo los valores basales de FSH no varían entre los sujetos del sexo masculino, pero en el sexo femenino, con el avance puberal cambian y se ven más aumentados en los grupos F3-P4 y F5 respecto al grupo P1, lo cual ya ha sido señalado en la literatura.

- III. - Como resultado del estímulo, la respuesta de ambas hormonas fue positiva en todos los grupos, aún en los prepúberes. Se destaca esta respuesta puberal porque confirma el conocido valor de LHRH como prueba de reserva hipofisaria de gonadotropinas antes de la aparición de los caracteres sexuales secundarios.
- IV. - La respuesta de FSH puede ser mayor en las niñas prepúberes: algunas de las respuestas individuales de este grupo han sido las más altas de todas, en la muestra estudiada. Ya se ha señalado el predominio de los valores basales de FSH en niñas con pubertad avanzada. En el grupo de niñas con pubertad incipiente, FSH ha respondido con valores significativamente más altos que en los varones del mismo grupo. Sin embargo, en ellos FSH no varió con el avance de los estadios puberales. Se hace resaltar esta observación que apunta una vez más la diferencia entre los sexos en cuanto a la secreción de FSH observada desde los primeros estadios embrionarios, a través de la infancia y en la pubertad, relacionada con la actividad ovárica folicular propia de la niña en todas las edades.
- V. - Los aumentos de LH son notables en el comienzo de la pubertad, mientras que la respuesta de FSH no varía. Considerando los tipos de respuesta de ambas hormonas antes y durante la aparición de los primeros signos de pubertad, se puede decir que hay un tipo de respuesta de gonadotropinas prepuberal y otro puberal.

- VI. - La respuesta de LH también es mayor en los grupos con más avanzado desarrollo sexual, respecto a los grupos prepuberales, demostrando que LH está aumentada con el avance del desarrollo puberal, pero FSH permanece igual. Esto coincide con algo que es ya sabido: respuestas de LH mayores que de FSH. Se especula sobre el posible efecto retrógrado de la inhibina en el control de FSH, dado que la respuesta de FSH es relativamente mayor en los prepúberes.
- VII. - Al comparar las respuestas de LH entre sexos, se han encontrado las siguientes variaciones: han sido mayores en los varones que en las hembras antes y en el comienzo de la pubertad. Pero en las hembras con pubertad avanzada han resultado mayores que en los varones. Las diferencias de la respuesta de LH al estímulo LHRH entre los sexos han sido revisadas en la literatura, encontrándose ciertas discrepancias sobre el predominio de la respuesta en uno u otro sexo, entre adultos, y cierta tendencia a aceptarse que en el hombre puede ser mayor la respuesta cuando se la compara con la obtenida en la mujer en la fase de estrógenos bajos.
- VIII. - En cuanto a la Prolactina: se ve que los valores basales de la misma son semejantes, sin diferencias de edad ni sexo. Las respuestas tras el estímulo son semejantes, sin variaciones entre grupos, con distinto avance de desarrollo sexual. Pero, cuando se comparan las respuestas al estímulo entre uno y otro sexo, se ve que en el grupo de hembras

con pubertad incipiente (F1), la respuesta es mayor que en los varones del mismo grupo. Por ello se especula en este estudio acerca de la posible influencia de esta diferencia en la respuesta de PRL sobre las respuestas de gonadotropinas en este grupo, que fueron: FSH elevadas y LH baja, respecto a los varones.

IX. - No hay diferencias de los valores basales de TSH entre los sujetos con distinto grado de desarrollo puberal ni entre los sexos. La única diferencia encontrada es que la respuesta fue mayor en las niñas con pubertad avanzada que en las niñas prepúberes.

X. - Los valores basales de HGH son iguales en todos los sujetos, y respecto a la respuesta, en el estudio de la muestra se ha observado que no difieren entre los sexos, pero sí de acuerdo con el avance de la maduración del individuo. Se ve que en los adultos estudiados la respuesta fue significativamente mayor que entre los prepúberes. Esto se hace mucho más evidente en las niñas, puesto que los valores de la respuesta fueron mayores en los grupos con pubertad incipiente y pubertad avanzada respecto al grupo prepuberal. Probablemente se vea en esta respuesta el efecto de los estrógenos en potenciar la respuesta de HGH en el sexo femenino, relacionado con la homeostasis entre glucosa, insulina, HGH y los procesos de reproducción en la mujer.

BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM, C. E., ODELL, W. D., SWERDLOFF, R. S. and HOFFER, K.: Simultaneous radio-immunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17 = hidroxiprogesterone and stradiol-17 beta, during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 34, 312, 1972.
- ALGARRADA RUIZ, M: Insuficiencias hipofisarias parcelares. Sheehan Simmond. Conferencia pronunciada en el X Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P. , el 7 de diciembre de 1976.
- ALVAREZ COCA, M: Pubertad precoz. Libro del III Curso Internacional de Endocrinología Clínica: V. Pozuelo y J. Tamarit S. S. , 1970.
- ALVAREZ COCA, M: Hipogonadismo hipogonadotrófico con anosmia. Comunicación II Jornadas endocrinológicas de Sevilla, 29-30 de noviembre de 1974.
- ANGSUSINGHA, K., RICHARDS, C., BRYCH, M. and KENNY : Serum estrone (E1) and estradiol (E2) in normal and abnormal conditions from infancy through adolescence. University of Pittsburgh School of Medicine, Dept. of Pediatrics, Pittsburgh, PA., 1973. (Instituto Nacional de Inf. y Documentación en Bio-medicina, Facultad de Medicina, Valencia).
- ANTAKI, A., SOMMA, M., WYMAN, H., and CAMPENHOUT, J. van: Hypothalamic pituitary function in the olfator-genital syndrome. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 38: 1083, 1974.
- ARIMURA, A., KASTIN, A. J., and SCHALLY, A. V.: Immunoreactive LH-releasing hormone in plasma: mid-cycle elevation in women. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 38, 510, 1974.

- AUBERT, M. L., GRUMBACH, M. M., and KAPLAN, S. L.: Heterologous radio-immunoassay for plasma human prolactin (h PRL); values in normal subjects, puberty pregnancy and pituitary disorders. *Acta Endocrinológica* 77, 460-476, 1974.
- BEHAR, B. R., MENDILAHARZU, H. de, RIVAROLA, M. A., and BERGEDA, C.: Gonadotropin secretion in prepubertal and pubertal primary hypogonadism: response to LHRH. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 41: 1070, 1975.
- BENGOA, M. A., MOLA, S., ALGARRADA, M., LAHER, E., NAVARRRO, N. y RAMOS M. C.: Estudio de la reserva funcional hipofisaria por varopresina en una serie de enfermos de insuficiencia hipofisaria. Comunicación a la VIII Reunión Luso-Española de End., Oporto, 1970
- BESSER, G. M., RATCLIFFE J. G., KILBORN, J. C., ORMSTON, B. J. and HALL, R.: Interaction between thyrothrophin, corticotrophin and growth hormone secretion in man. *Journal of Endocrinology* 51, 699, 1971.
- BOHNET, H. G., DAHLEN, H. G., WUTTKI, M. and SCHNEIDER, H. P. G.: Hyperprolactinemia anovulatory syndrome. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 42, 132-142, 1976.
- BOWERS, C. Y., FRIESEN, H. G., HWANG, H., GUYDA, H. G. and FOLKERS, K.: Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl-prolinamide. *Biochem Biophys Res. Commun* 45: 1033, 1971.
- BOYAR, R. M., ROSENFELD, R. S., KAPEN, S., FINKELSTEIN, J. W., ROFFWARG, H. P., WEITZMAN, E. D., and HELLMAN, L.: Simultaneous augmented secretion of luteinizing hormone and testosterone during sleep. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 54, 609-618, Sept. 1974.
- BULLON RAMIREZ, A.: Anatomía Patológica de los tumores del sistema nervioso. ed. Paz, Montalvo, 1962.

- BULLON RAMIREZ, A.: Paratiroides. Morfología. Conferencia pronunciada en el VI Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 28 de mayo de 1973.
- BULLON SOPELANA, A.: Testes. Biomorfología. Conferencia pronunciada en el XI Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 17 de abril de 1977.
- CANO IGLESIAS, F.: Hiperplasia adrenogenital congénita. Tribuna Médica, 8 septiembre 1972.
- CACCIARI, E., CICOGNANI, A., PIRAZZOLI, P., TASSONI, P., ZAPPULLA, P., SALARDI, S. and BERNARDI: Relationship among the secretion of ACTH, GH and Cortisol during the insulin-induced hypoglycemia test in the normal and obese child. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 40: 802, 1975.
- CONTE, F., GRUMBUCH, M. and KAPLAN, S.: A diphasic pattern of gonadotropin secretion in patients with a syndrome of gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 40: 670, 1975.
- CORTES, J.: Uso, diagnóstico y terapéutica del LHRH. Comunicación, II Jornadas endocrinológicas de Sevilla, 29-30 nov., 1974.
- CORTES PRIETO, J., GARCIA, M. D., y ORIOL-BOSCH, A.: Evaluation of the response of plasma FSH and LH at 150 minutes following a double stimulation with synthetic FSH-LH/RH as a test of pituitary function. Results obtained in normal women at different stages of the menstrual cycle. *Reproducción Vol. 1, N° 4, 1974.*
- COSSIA, A. M., FLEISCHER, N., BESCH, P. K., BROWN, C. P., and DESIDERIO, D.: The effect of luteinizing hormone releasing factor on plasma LH levels in pituitary disease. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 38: 83, 1974.

CHAUSSAIN, J. J., GARNIER, P. E., BINET, E., VASSAL, J., SCHOLLER, R., and JOB, J. C.: Effect of synthetic luteinizing hormone releasing-hormone (LHRH) on the release of gonadotropins in hypophyso-gonadal disorders of children and adolescents. III Hypopituitarism. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 38: 58, 1974

CHRISTY, W. P., THOMASI, T. B., and HOLUB, D. A.: Primary ovarian, thyroidal, and adrenocortical deficiencies, simulating pituitary insufficiency, associated with diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 22: 155, 1962.

DOCUMENTA GEIGY, Tablas Científicas. J. R. Geigy S. A., Ed. Basilea, Suiza, 6a. Edición.

EHARA Y., SILER, J., VANDENBERG, G., SINHA, Y. N., YEN, S. C.: Circulating prolactin levels during the menstrual cycle: Episodic release and diurnal variation. *J. Obstetrics and Gynecology*, March 25, 1973.

FERNANDEZ CRUZ, A.: Fisiología Clínica y diagnóstico semiológico. Ed. Científica Médica, Barcelona, 1968.

FERNANDEZ CRUZ, A.: Síndrome adrenogenital. Patología y Clínica. Conferencia pronunciada en el III Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 30 mayo 1970.

FERNANDEZ CRUZ, A.: Hipogonadismos hipofisarios. Exploración hormonal. Clínica y Tratamiento. Conferencia pronunciada en el VI Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 7 junio 1973.

FLOREZ TASCON, F. J.: Aspectos actuales de la regulación diencefálica de la adenohipófisis. Conferencia pronunciada en el III Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 19 enero 1970.

- FLOREZ TASCÓN, F. J.: Algunos síndromes pluriglandulares. *Anales de Endocrinología y Nutrición*, 43, N° 1, 1973.
- GARCIA CENTENERA, A.: Síndromes del lóbulo anterior hipofisario. Conferencia pronunciada en el IX Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 17 noviembre 1975.
- GARCIA CENTENERA, A.: Patología de las hormonas gonadotróficas. Conferencia pronunciada en el X Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 29 diciembre 1976.
- GARDNER, L.: *Endocrine and genetic diseases of childhood and adolescence*. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Ed. Lindond, Toronto, 1975.
- GARNIER, P. E.: Effect of LHRH on the release of gonadotropins in children and adolescents. VI. Relations to age, sex and puberty. *Acta Endocrinol (Kbh)* 77 (3) 422-34, nov. 1974.
- GENAZZANI, A. R., LEMARCHAND-BERAUD, T. H., AUBERT, M. L., and FELBER: Patterns of ACTH, GH and Cortisol during menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinal Metab.* 41: 431, 1975.
- GOBERNA, R.: Regulación de la secreción pancreática endocrina, acción de la GH-IF y del factor lipolítico hipofisario. Comunicación. II Jornadas endocrinológicas de Sevilla, 29-30 nov. 1974.
- GREULICH, W. W., and PYLE, S. L.: *Radiographic Atlas of skeletal development of the hand and wrist*. Second edition. Stanford University Press, Stanford, California, 1974.

- GUADALIX, F. J., CHARRO SALGADO, A., RAQUEL FERNANDEZ, y J., BOTELLA LLUSIA: Estudio de la Reserva hipofisaria mediante la sobrecarga de LHRH sintético en mujeres con amenorrea y anovulomenorrea. "Reproducción" Vol. 1, N° 3, 1974.
- GUAL, C., KASTIN, A. J., and SCHALLY, A. V.: Clinical experience with hypothalamic releasing hormone, part I. Thyrotropin releasing hormone. Recent Prog Horm Res 28: 173, 1972.
- HALL, R., WARRICK, C.: Hypersecretion of hypothalamic releasing hormones: a possible explanation of the endocrine manifestations of polyostatic fibrous dysplasia (Albright's syndrome). Lancet 1: 1313-1316, 1972.
- HERVAS OLIVARES, F.: Regulación de la Síntesis y Secreción de hormona de crecimiento por las hormonas tiroideas. Estudio por radioinmunoanálisis. Tesis Doctoral. Rev. Ibér. Endocr. 135, 1976.
- JACOBS, L. S., SNYDER, P. J., WILBER, J. F., UTIGER, R. D. y DAUGHADAY, W. H.: Increased serum prolactin after administration of synthetic thyrotropin-releasing hormone (TRH) in man. J. Clin. Endocrinol Metab 33: 996, 1971.
- JACOBS, L. S., SNYDER, P. J., UTIGER, R. D. y DAUGHADAY, W. H.: Prolactin response to thyrotropin-releasing hormone in normal subjects. J. Clin. Endocrinol Metab 36: 1.069, 1973.
- JENNER, M. R., KELCH, R. P., KAPLAN, S. L. and GRUMBACH, M. M.: Hormonal changes in puberty. IV. Plasma estradiol, LH and FSH in prepubertal children, pubertal females and in precocious puberty, premature telarche, hypogonadism, and in a child with a feminizing ovarian tumor. J. Clin. Endocrinol Metab 34, 521, 1972.
- JOB, J. C., GARNIER, P. E., CHAUSSAIN, J. L., and MILHAUD, G.: Elevation of serum gonadotropins (LH and FSH) after releasing hormone (LHRH) injection in normal children and in patients with disorders of puberty. J. Clin. Endocrinol Metab 35: 473, 1972.

- JOB, J. C., GARNIER, P. E., CHAUSSAIN, J. L., and CANLORBE, P.: Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) on the release of gonadotropins in hypophyso-gonadal disorders of children and adolescents. II Precocious puberty and premature thelarche. *Biomedicine*, 19, 77-81, 1973.
- KASTIN, A. J., SCHALLY, A. V., GUAL, C., MIDGLEY Jr., A. R., BOWERS, C. Y., y DIAZ INFANTE, A.: Stimulation of LH release in men and women by releasing hormone purified from porcine hypothalamus. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 29, 1046-1050, 1969.
- KELCH, R. P., CLEMENS, L. E., MARKOV, M., WESTHOFF, M. H. and HAWKINS, D. W.: Metabolism and effects of synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in children and adults. *J. Clin. Endocrinol Metab* 40, 53, 1975.
- KULIN, H. E. and REITER, E. O.: Ontogeny of the in vitro uptake of tritiated estriadiol by the hypothalamus of the female rat. *Endocrinology*, 90: 137, 1972.
- LEE, P., MIDGLEY, A. R., and JAFFER, R. B.: Regulations of human gonadotropine, serum folliculo-stimulating and luteinizing hormone determination in children. *J. Clin. Endocrinol Metab* 31, 248, 1970.
- LEE, P. A., JAFFER, R. MIDGLEY Jr., A.: Serum gonadotropin, testosterone and prolactin concentration through puberty in boys: a longitudinal study. *J. Clin. Endocrinol Metab* 39: 664, 1974.
- LEE, P. A., GAREIS, F. J.,: Gonadotropin and sex steroid response to luteinizing hormone-releasing hormone in patients with premature adrenarche. *J. Clin. Endocrinol Metab* 43: 195, 1976.
- LENCIONI, L.: *El Colpocitograma*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1962.

- LENCIONI, L.: El Urocitograma, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2a. edición, 1963.
- LOPEZ ARIAS, C. Adenohipófisis. Hormonas hipófisarias del lóbulo anterior. Conferencia pronunciada en el IV Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 8 de marzo de 1971.
- MAEDA, K., KATO, Y., CHIHARA, K., SHOZO, O., YOSHIKO, I., HIROMI, A. and IMURA, H.: Suppression by thiotropin-releasing hormone (TRH) of growth hormone release induced by arginine and insuline-induced hypogluccemia in man. J. Clin. Endocrinol Metab 43: 453, 1976.
- MARAÑÓN, G.: El crecimiento y sus trastornos. "Espasa Calpe" Editores, Madrid, 1953.
- MARSHALL, W. A., y Tanner, J.: Variations in pattern of pubertal changes in girls. Arch. Dis. Child. 44, 291, 1969; y 45, 13-23, 1970.
- MATTINGLY, D.: A simple fluorometric method for the stimation of free 11 hidroxycorticords in human plasma. J. of Clinic Pathology. Vol. 15, 374-379, 1962.
- MAUVAIS-JARVIS, P., LECONTE, P., et KUTTENN, F.: La gynecologie endocrinienne en 1977. Gynecologie medicale 27, 17 (21 mars) 1977.
- MCCANN, S. M. and PORTER, S. C.: Hypothalamic pituitary stimulating and inhibiting hormones. Physiol. Rev. 49: 240, 1969.
- McGUFFIN, W. and ROGOL A.: Response to LHRH and clomiphene citrate in two women with the Prader-Labhart-Willy Syndrome. J. Clin. Endocrinol Metab 41: 325, 1975.

- MERIMEE, T. and FINEBERG, S.E.: Studies of the sex based variation of human growth hormone secretion. *J. Clin. Endocr.* 33: 896, 1971.
- MIDGLEY, Jr. A.R., JAFFER, R.B.: Regulations of human gonadotropins: X. Episodic fluctuation of LH during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol Metab* 33: 962, 969, 1971.
- MOGHISSI, K.S. et al.: A composite picture of the menstrual cycle. *American Journal Obstet. Gynecol.*, October 1972.
- MORTIMER, C.H., BESSER, G.M., McNEILLY, A.S., and TURNBRIDGE, W.M.G.: Interaction between secretion of gonadotropins, prolactin, growth hormone, thyrotropin and corticosteroids in man: Effect of LH/FSH-RH, TRH and hypoglycemia alone and in combination. *Clin Endocrinol* 2: 317, 1973.
- NAVARRO ANGULO, N.: Edad de la menarquia en las mujeres españolas. Encuesta de los años 1970/72. Tesis Doctoral, 1974.
- NOEL, G.L., SUH, H.K., STONE, J.G. y FRANTZ, A.G.: Human prolactin and growth hormone release during surgery and other conditions of stress. *J. Clin. Endocrinol* 35, 840, 1972.
- ORIOLO BOSCH, A.: Dinámica de la respuesta al LHRH. Comunicación. II Jornadas Endocrinológicas de Sevilla, 29-30 nov. 1974.
- PERALTA SERRANO, A.: Patología del crecimiento y desarrollo del niño, 1976.
- PEREZ LOPEZ, F.R. y L'Hermite. Prolactina. *Medicina Clínica*, Vol. 63, N° 7, pág 353-360, 1974.
- PEREZ MERIDA, M. del C.: Estados endocrino-metabólicos tras talbutamida, Tesis Doctoral, 1976 (en prensa).

- POZUELO, V., ALGARRADA RUIZ, M., NAVARRO, N., SUÑER MORRA, A. y CASTELL, C.: Síndromes clínicos gonadales de origen hipotálamo-hipofisario. Síntesis de una experiencia. *Anales de Endocrinología y Nutrición*, 293, N° 4, 1972.
- POZUELO, V.: Clínica hipotalámica e hiperósteosis frontal interna. Comunicación, II Jornadas Endocrinológicas de Sevilla, 29-30 nov. 1974.
- RAKOFF, J. S., SILER, T. M., SINHA, Y. N. and YEN, S. S. C.: Prolactin and growth hormone release in response to sequential stimulation by arginine and synthetic TRF. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 37: 641, 1973.
- RAKOFF, J., VANDEN BERG, G., SILER, T. M., YEN, S. S. C.: An integrated direct functional test of the adenohipophysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, June 1, 1974.
- RASTOGI, G. K., DASH, R. J., SHARMA, B. R., SAWHNEY, R. C. and Siali, R.: Circadian responsiveness of the hypothalamic-pituitary axis. *J. Clin. Endocrinol Metab* 42: 798, 1976.
- REQUEJO FERNANDEZ, F.: Acciones endocrino-metabólicas de la hormona de crecimiento. Resultado de su aplicación en enanismo hipofisario. Tesis Doctoral, 1976 (en prensa).
- REQUEJO FERNANDEZ, F.: Patología de la hormona de crecimiento. Enanismos. Conferencia pronunciada en el X Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el 26 diciembre 1976.
- ROTH, J. C., KELCH, R. P., KAPLAN, S. L. and GRUMBACH, M. M.: FSH and LH response to luteinizing hormone-releasing factor in prepubertal and pubertal children, adult males and patients with hypogonadotropic and hypergonadotropic hypogonadism. *J. Clin Endocrinol Metab* 35: 926, 1972.

- REITER, E. O., KAPLAN, S. L., CONTE, F. A. y GRUMBACH, M. M.: Responsivity of pituitary gonadotropes to luteinizing hormone-releasing factor in idiopathic precocious puberty, precocious thelarche, precocious adrenarche, and in patients treated with medroxyprogesterone acetate. *Pediatr. Res.* 9: 111, 1975.
- SCHALCH, D. S., GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A. J., LANDA, L., LEE, L. A., ZAMORA, M. and SCHALLY, A. V.: Plasma gonadotropins after administration of LH releasing hormone in patients with renal or hepatic failure. *J. Clin Endocrinol Metab* 41: 921, 1975.
- SCHALLY, A. V.: Hipotálamo y la Reproducción. (Recientes estudios sobre la hormona hipotalámica liberadora de LH y FSH). *Anales de Endocrinología y Nutrición*, Vol. 1, N° 5, 1972, Madrid.
- SCHONBERG, D. K.: Dinámica de la función hipotálamo-pituitaria durante la pubertad, pág. 78, *Trastornos de la pubertad 3/1*, Clínica Endocrinológica, Ed. Salvat, 1976.
- TAMARIT TORRES, J.: *Fisiología General*, Tomo 1, Membrana Celular, 1965.
- TAMARIT TORRES, J.: Concepto de la Endocrinología. Fisiopatología endocrina. Conferencia pronunciada en el VII Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., 6 octubre 1973.
- TAMARIT TORRES, J.: Bioquímica de las hormonas del lóbulo posterior hipofisario. Conferencia pronunciada en el X Curso Internacional de Endocrinología Clínica, Servicio de Endocrinología y Nutrición, Prof. Pozuelo Escudero, Ministerio de Trabajo, I. N. P., el día 1 diciembre 1976.

- TANNER, J. M., WHITEHOUSE, R. H. and TAKAISHI, M.: Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity and weight velocity: british children, 1965. Arch. Dis. Childh., 41, 613, 1966.
- VOIGT, K. H., DAHLEN, H. G., FAHM, H. L., BIRK, H., SCHRODER, K., SCHNEIDER, H. P. G., ROTHENBUCHNER, G., and PFEIFFER, E. F.: Simultaneous stimulation test for the anterior pituitary hormones. Horm. Metab. Res. 6, 436-437, 1974.
- WERNER, G., SCHROFFNER and FURTH, E.: Hypogonadotropic hypogonadism with anosmia (Kallmann's Syndrome) unresponsive to clomiphene citrate. J. Clin. Endocrinol 31: 267, 1970.
- WINTER, S. D. J., FAIMAN, Ch., HOBSON, W., Aduvala, V., PRASAD and REYES, F.: Pituitary-gonadal relations in infancy. I Patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and chimpanzee. J. Clin. Endocrinol. Metab 40: 545, 1975.
- WINTER, S. D. J., HUGHES, J. A., REYES, F., FAIMAN, CH.: Pituitary-gonadal relation in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. J. Clin. Endocrinol Metab 42: 679, 1976.
- WUTTKE, W., DOHLER, K. D. and GELATO, M.: Oestrogens and prolactin as possible regulators of puberty. J. Endocr. 68, 391-396, 1976.
- YALLOW, R. S. and BERSON, S. A.: Topics on radio-immunoassay of replide hormones, Protein and Peptide hormones. Proceeding of the Internacional Symposium, Liege, Belgium, Mayo 1968. Excerpta Medica, 1968.
- YEN, S. S. G., REBAR, R. VANDEN-BERG, G., NAFTOLIN, F., EHARA, Y., RYAN, K. J. and GUILLERMIN, R.: Clinical studies with synthetic luteinizing hormone releasing factor (S. C. R. F). Serno Foundation Conference 28 - 1 junio-julio, Acapulco, Mexico, 1972.

YEN, S. S. G., VANDEN-BERG, G. and REBAR, R.: Variation of pituitary responsiveness to synthetic LRF during different phases of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol Metab* 35, 931, 1972.

YEN, S. S., EHARA, Y. and PHER, T. M.: Augmentation of prolactin secretion by estrogens in hypogonadal women. *J. Clin. Invest.* 53, 652-655, 1974.

ZARATE, A., KASTIN, A. J., SORIA, J., CANALES, E. and SCHALLY, A. V.: Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in two brothers with hypogonadotropic hypogonadism and anosmia. *J. Clin. Endocrinol Metab* 36: 612, 1973.