

DETERMINACION DE CORTICOIDES EN PLASMA
SANGUINEO *

DR. FRANCISCO DURAZO Q. **

DR. JUAN JOSÉ PAULLADA ***

DR. JOSÉ LUNA DEL VILLAR ****

SRITA. MICAELA DEL CANTO *****

LA DETERMINACIÓN cuantitativa de los corticoides suprarrenales en la sangre periférica, ha permitido conocer y medir con mayor precisión la función glucocorticoide de la corteza suprarrenal, y acercarse a un mejor entendimiento de ciertos procesos que originan disfunción corticosuprarrenal. Esto ha sido posible una vez que han sido vencidas las dificultades técnicas, que han permitido poner al servicio de la clínica, un método práctico y relativamente económico.

Aunque con anterioridad se habían descrito algunos procedimientos biológicos y químicos,^{7,8} corresponde a Nelson y Samuels,⁹ la introducción de una técnica aceptable, con aplicación a la clínica; pero su complejidad hizo que no fuera utilizada en gran escala. No fue sino hasta 1954, en que Silber y Porter publican su método,² para la investigación de corticoides en plasma y orina, que el mismo estuvo al alcance de la rutina clínica. De entonces a la fecha se han sucedido numerosas publicaciones, con modificaciones originales que han aumentado su sensibilidad y especificidad, y lo colocan a la cabeza de los medios con que cuenta la clínica para la medición de la función corticosuprarrenal.

La producción de insuficiencia adrenocorticotrófica de origen endógeno que ocasiona atrofia corticosuprarrenal y secundaria a la administración terapéutica

* Trabajo realizado en el Laboratorio de Hormonas y Metabolismo del Hospital General. Leído en la sesión del día 20 de julio de 1960.

** Jefe de Laboratorio de Hormonas y Metabolismo.

*** Endocrinólogo del Hospital General.

**** Del Laboratorio de Hormonas y Metabolismo.

***** Del Laboratorio de Hormonas y Metabolismo.

de glucocorticoides, ha proporcionado un número importante de sujetos con insuficiencia suprarrenal subclínica, que unido a los pacientes con insuficiencia discreta por otra etiología, constituyen un grupo importante. Esta disfunción es evidenciable únicamente ante situaciones de "stress" de cierta magnitud ("stress" quirúrgico), y se manifiesta clínicamente por hipotensión postoperatoria severa, y no explicable por otra causa. Esta situación ha proporcionado al laboratorio la responsabilidad de descubrir esta pérdida de la reserva funcional suprarrenal, de preferencia en el preoperatorio, y no en el trans o postoperatorio, y para ello la determinación de los corticoides plasmáticos es el procedimiento que ha demostrado mayor eficacia. De aquí nuestro interés por contar con este método en la rutina hospitalaria, y por presentar a ustedes nuestras observaciones iniciales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Método. Se empleó la modificación de Peterson y col.¹ al método de Silber-Porter,² basado en la reacción de color descrita por estos autores, entre los esteroides con cadena lateral de 17, 21 dihidroxi 20 cetona (cromógenos de Porter-Silber), y la fenilhidrazina en medio ácido, para formar fenilhidrazonas de color amarillo, con un máximo de absorción a una longitud de onda de 410 milimicrones (fig. 1).

Las modificaciones al método original de Silber-Porter, propuestas por Peterson son: a) el empleo de diclorometano en lugar de cloroformo, y su purificación en columna de sílica; b) el uso de pequeños volúmenes de fenilhidrazina, lo que hace posible el empleo de una pequeña cantidad de plasma, y aumenta la sensibilidad de la medida de la reacción, y c) desarrollo de color por incubación a temperatura ambiente.

Reactivos. 1. *Diclorometano* (CH_2Cl_2 Eastman) es purificado pasándolo a través de una columna de sílica gel (100 mesh) de 7 por 130 cms. La efectividad de la purificación se determina: mezclando una alícuota de 20 cc. del solvente con 0.5 cc. del reactivo de fenilhidrazina, y dejando reposar a temperatura ambiente durante la noche. Ningún color deberá desarrollarse durante este tiempo. El solvente puede permanecer libre de impurezas por varios meses a temperatura ambiente.

2. *Hidróxido de sodio* 0.1 N.

3. *Acido sulfúrico* al 64%. 640 cc. de ácido sulfúrico se agregan a 360 cc. de agua bidestilada, manteniendo el recipiente a baño maría, de agua corriente.

4. *Alcohol etílico.* Se purifica por adición de 7 gr de nitrato de plata y 15 gr de hidróxido de potasio, separadamente (cada uno se disuelve en 100 cc. de alcohol etílico) a 4 litros de alcohol etílico absoluto.

Se mezclan, se dejan reposar durante la noche y se destilan descartando los primeros 700 cc. y los últimos 100 cc.

La efectividad de la purificación se determina haciendo reaccionar una alícuota de alcohol con reactivo de fenilhidrazina. No debe presentarse desarrollo de color después de incubación a temperatura ambiente durante la noche.

5. *Fenilhidrazina hidrociorhídrica* (Baker's q.p). Es purificada por adición de 100 gr de fenilhidrazina a una mínima cantidad de agua caliente (200 cc. entre 60 y 70° C.), por agitación constante se requieren de 1 a 3 horas para disolverse. Lleve un litro de alcohol etílico hasta la ebullición, y agréguelo a la fenilhidrazina; filtre rápidamente a través de Whatman núm. 2, estando todavía caliente. Enfríe en el refrigerador y colecte los cristales sobre un filtro de poro medio. Repita el proceso de recristalización 2 veces.

disolviendo los cristales en menor cantidad de agua cada vez. Al final de la segunda vez los cristales son lavados con alcohol etílico frío y secados cuidadosamente; los cristales son entonces guardados en frasco ámbar, en desecador.

6. "Blank" de reactivos. Mezclar 2 partes de ácido sulfúrico al 64% con una parte de etanol.

7. Reactivo de fenilhidrazina en ácido sulfúrico. 50 mgs de fenilhidrazina purificada se disuelven en 50 cc. de "Blank". Se prepara reciente, antes de usarse.

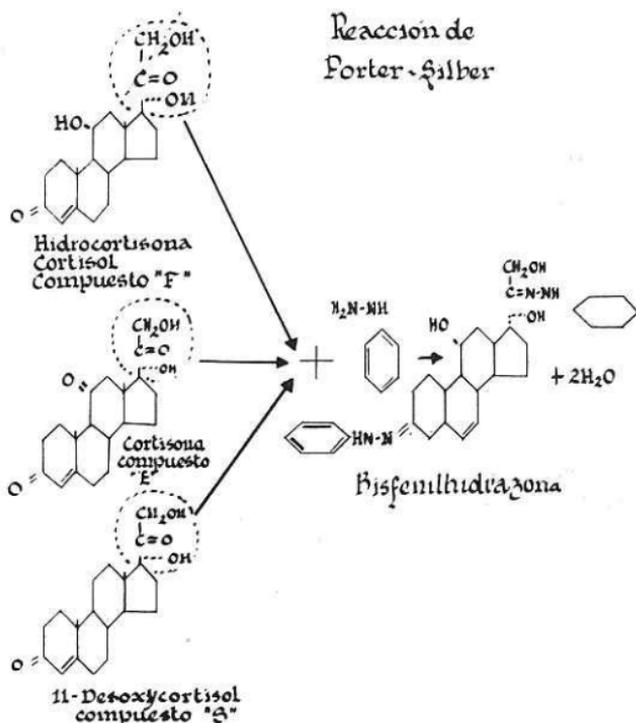


FIG. 1

8. Standard de hidrocortisona. 100 mgs de hidrocortisona-alcohol se disuelven en 100 cc. de alcohol etílico absoluto (sol A). 1 cc. de A. se diluye en 200 cc. de agua bidestilada (5 gamas por cc.).

PROCEDIMIENTO. Toda la vidriería utilizada debe ser escrupulosamente lavada, primero con jabón y agua y después con ácido sulfúrico concentrado (fig. 2).

EXTRACCION. Agregue 5 cc. de plasma heparinizado a 25 cc. de diclorometano en un matraz Erlenmeyer de 200 cc.

Ponga en un agitador y extraiga 10' por rotación suave. Se extrajo por duplicado una muestra comparando la extracción manual con la extracción mecánica, obteniendo mayor recuperación con la agitación mecánica (12%) (fig. 3).

Transfiera cuidadosamente la mezcla plasma-solvente, a una probeta de 25 cc. (Evite la agitación violenta que produce emulsiones difíciles de separar.)

Lavado. Descarte la capa de plasma por aspiración, y agregue 2 cc. de hidróxido de sodio 0.1 N. al diclorometano; agite vigorosamente por 20 segundos, y descarte la capa de sosa por aspiración.

DETERMINACION DE 17 HIDROXICORTICOSTEROIDES EN PLASMA

(Método de Silber-Porter)

Modificado por Peterson

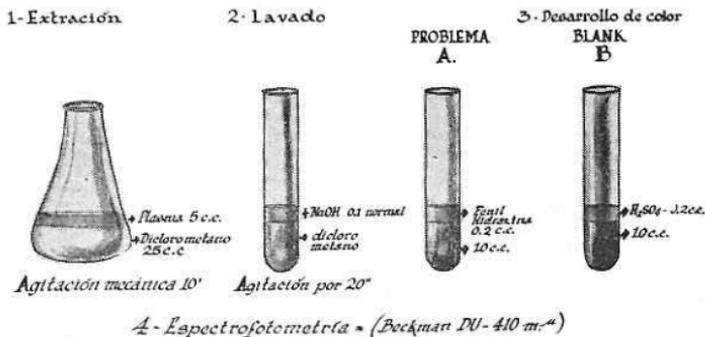


FIG. 2

Desarrollo de color. En 2 tubos de 15 cc. ponga en cada uno: 10 cc. del extracto de diclorometano (Problema A- "Blank" B); al problema A agregue 0.2 cc. de reactivo de fenilhidrazina; al "Blank" B. agregue 0.2 cc. del "Blank" de reactivos. Tape los tubos y agite

EFEECTO DE LA AGITACION

	Agitación	
	Manual	Mecánica
PLASMA	µg. %	µg. %
A	16.0	19.0

FIG. 3

vigorosamente por 20 segundos, y después deje reposar 30'. Descarte la capa sobrenadante de diclorometano por aspiración y deje reposar a temperatura ambiente por espacio de 8 a 24 horas para obtener el máximo desarrollo de color. La incubación a temperatura

ambiente fue comparada con incubación a 60° C., durante 10' en duplicados de las muestras, obteniéndose un incremento de 25% en las muestras sometidas a incubación a temperatura ambiente (fig. 4).

Espectrofotometría. Transfiera el contenido de los tubos (A y B) a microcubetas (de 1.5 × 10 × 15 mm) y mida la densidad óptica, contra un Blank de agua bidestilada a una longitud de onda de 410 mμ, en un espectrofotómetro Beckman D.U.: con un reductor del haz luminoso, de 1 mm.

Simultáneamente con cada lote de problemas se corre un blank de reactivos (5 cc. de agua bidestilada), y un standard de 5 cc. de agua bidestilada conteniendo 5 gamas de hidrocortisona, los cuales se procesan igual que los problemas (A y B).

Cálculos. D.O. del problema A — D.O. del problema B = a.
D.O. del "Blank" A — D.O. del "Blank" B = b.
a-b = Densidad Óptica corregida para el problema (P).
D.O. del "standard" A — D.O. del "standard" B = c.
c-b = Densidad óptica corregida para el "standard" (E).
 $\frac{P}{E} \times 5 \text{ gamas} \times 20 = \text{microgramos de hidrocortisona por } 100 \text{ cc.}$

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

PLASMA	Incubación	
	10' a 60°c. μg. %	Temp. ambiente μg. %
Nº 1	7.0	9.0
Nº 2	23.0	35.0

FIG. 4

Con objeto de determinar el máximo de absorción de la hidrazona, se hizo una curva del espectro de absorción con el "Standard" de hidrocortisona, encontrando el máximo a 410 milimicrones de longitud de onda.

Recuperación. La recuperación de la hidrocortisona fue probada con el procedimiento descrito, utilizando 4 plasmas, a los que se agregaron 10 gamas de hidrocortisona; los resultados representados en la (fig. 5) acusan una recuperación promedio de 87%.

Material clínico. Con objeto de determinar las cifras normales de corticoides plasmáticos, se estudiaron 71 personas adultas de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 40 años, seleccionados entre los asistentes al laboratorio clínico, para estudios rutinarios de admisión, después de pasar un examen físico satisfactorio, es decir son sujetos clínicamente sanos, 62 hombres y 9 mujeres. Fueron citadas al laboratorio a las 8.30 a. m. en condiciones las más cercanas a las basales, para verificar la toma de sangre, la cual se practicó utilizando jeringas y tubos previamente tratados con ácido sulfúrico, utilizando heparina como anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas dentro de los 60' después de su obtención y el plasma extraído a continuación. Con objeto de medir

la respuesta suprarrenal a la corticotrofina, a través de las modificaciones en la concentración de los corticoides plasmáticos, se practicaron determinaciones antes y después de la administración de H. A. C. T. simple y de acción lenta (Zinc), por vía intramuscular, en sujetos clínicamente normales y en 4 sujetos con síndrome de Addison. Se hizo una sola aplicación de 25 mgs de H. A. C. T. por vía endovenosa en un enfermo con tuberculosis renal unilateral. En una paciente adrenalectomizada por cáncer mamario, en tratamiento de sostén, se determinaron los corticoides plasmáticos a la hora, cuatro y siete horas, después de la administración de 40 mgs de hidrocortisona.

RECUPERACION DEL CORTISOL AGREGADO AL PLASMA

Plasma	Cortisol en 5 c.c. de Plasma.				
	Presente	Agregado	Encontrado	Recuperado	
	$\mu\text{g.}$	$\mu\text{g.}$	$\mu\text{g.}$	$\mu\text{g.}$	%
1	1.0	10.0	9.2	8.2	85.6
2	0.55	10.0	9.5	8.95	90.0
3	5.0	10.0	11.7	8.7	90.0
4	1.2	10.0	9.6	8.4	85.0

FIG. 5

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el grupo de personas del sexo masculino (62) se muestran en la figura 6. El valor más bajo fue de 2 gamas, el más elevado fue de 49 gamas. Se obtuvo una media aritmética de 16.3 gamas por 100 cc. de plasma y desviación "standard" (D. S.) de 9.4. En el grupo de 9 mujeres estudiadas, se obtuvo una media aritmética de 16.56 y D. S. de 6.7. Los valores obtenidos en estos grupos, sometidos al análisis estadístico, demuestran que las medias y las variancias no difieren significativamente, por lo que pueden combinarse las dos series de observaciones, obteniéndose para todo el grupo de 71 personas de ambos sexos, una media aritmética de 16.19 y D. S. de 9.12 (fig. 7). Si tomamos la media aritmética \pm una vez la D. S., obtenemos valores extremos de 7.07 y 25.3 gamas por 100 cc.

La respuesta al H. A. C. T. simple, a la dosis de 50 mg por vía intramuscular, se estudió en 7 personas adultas de ambos sexos, quienes no presentaron ninguna manifestación clínica ni de laboratorio, de insuficiencia suprarrenal. La extracción de sangre fue practicada 3 horas después de la aplicación de la hormona, ya que se encontró precisamente en este intervalo, la máxima elevación. Los resultados obtenidos se expresan en la figura 8. Se puede apreciar que en todas ellas se obtuvo una elevación, a las 3 horas, igual a 4 a 5 veces la cifra obtenida

como control. Esta misma prueba de estimulación, a igual dosis, fue realizada en 4 pacientes con síndrome de Addison; en ellos se obtuvo una respuesta muy

DETERMINACIÓN DE CORTICOIDES EN PLASMA SANGÜINEO
Adultos normales (20 a 40 años)

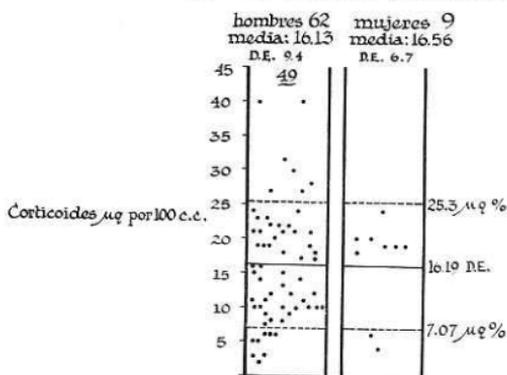


FIG. 6

inferior, a la obtenida con el grupo normal, ya que como control se obtuvieron cifras muy cercanas a 0; y a las tres horas se elevaron a cifras normales (8, 10, 15 y 17 gamas por ciento respectivamente) para caer nuevamente a las seis horas.

DETERMINACIÓN DE CORTICOIDES EN PLASMA SANGÜINEO
Adultos normales de ambos sexos entre 20 y 40 años

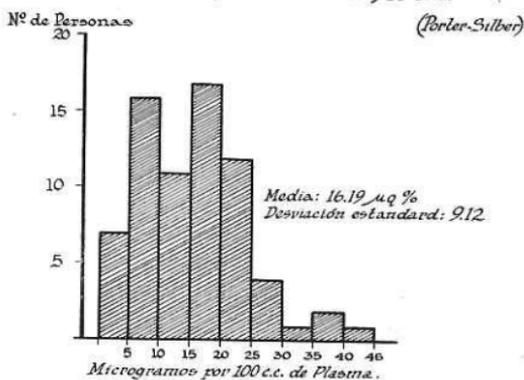


FIG. 7

En vista de la inactivación de la corticotrofina en el músculo y en la circulación, se ha recurrido al empleo de dosis fraccionadas, de preferencia de acción lenta (Cor-

trophin-Zinc). Nosotros hemos obtenido magníficos resultados al emplear dos dosis de 40 U. de H. A. C. T. Zinc a las 0 y 12 horas, y obteniendo la muestra de sangre a las 24 horas de aplicada la primera dosis. Así medimos el descenso

CORTICOIDES EN PLASMA SANGUÍNEO

Respuesta a la corticotrofina
50 mlgrs. (simple) Intramuscular.

(Porter-Silber)

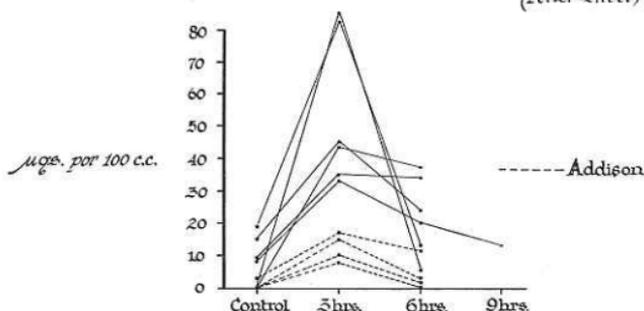


FIG. 8

en los eosinófilos circulantes y el ascenso en los 17K. y 17-OH urinarios. Esta misma modalidad la empleamos para observar el incremento de los corticoides plasmáticos a las 24 horas, en tres personas clínicamente normales; las tres dieron

CORTICOIDES EN PLASMA SANGUÍNEO

Respuesta a la corticotrofina
80 mlgrs. Zinc

(Porter-Silber)

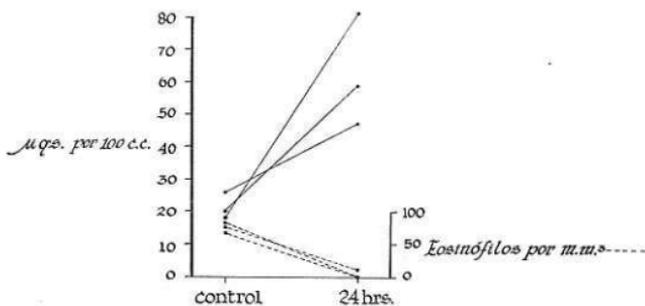


FIG. 9

una respuesta comparable a la observada en el grupo normal, con H. A. C. T. simple (fig. 9), es decir obtención de valor de 3 a 5 veces superiores a la cifra control (de 18 a 82 y de 20 a 59).

RESPUESTA A LA CORTICOTROFINA 25 mlgrs. (endovenosa)

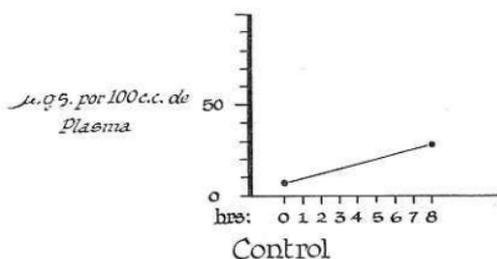
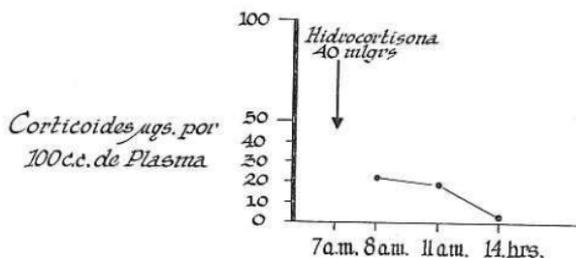


FIG. 10

La prueba endovenosa de 8 horas con 25 mg de H. A. C. T. se practicó en un enfermo de 30 años con diagnóstico de tuberculosis renal unilateral, normotenso, con regular estado de nutrición (fig. 10); se obtuvo un ascenso de 6 a 27 gamas a las 8 horas.

I. P. de M. (Ca. mamario) *Adrenalectomía bilateral*



Mayo 24

FIG. 11

En la enferma adrenalectomizada, se obtuvieron valores de corticoides plasmáticos de 22, 19 y 3 gamas por ciento, a las una, cuatro y siete horas, respectivamente, después de recibir 40 mg de hidrocortisona por vía oral (fig. 11).

DISCUSIÓN

En los estudios de la función adrenal en relación con la patología humana, la medida de los corticoides circulantes ha sido de gran utilidad ya que los niveles plasmáticos reflejan no solamente la secreción adrenal, sino también la rapidez con la cual los esteroides libres son removidos de la circulación por factores de conjugación, degradación, excreción y utilización. La modificación de Peterson al método original de Silber-Porter, creemos que ha proporcionado una gran aportación al reducir a 5 cc. la alícuota de plasma empleado, y al sustituir el cloroformo por diclorometano que evita la formación de una emulsión con el plasma, difícil de romper, y coloca el procedimiento al alcance de la clínica, por su sencillez, rapidez y relativa economía.

El manejo de la muestra de sangre es muy importante que se realice con material previamente tratado con ácido sulfúrico, para eliminar la presencia de cromógenos. Las recuperaciones obtenidas, son muy satisfactorias para los fines clínicos del método, al tener en cuenta la alícuota de plasma empleada.

Los resultados obtenidos con el grupo de personas normales están de acuerdo con los valores encontrados por Peterson y col.¹ en un grupo de 50 personas adultas de ambos sexos; ellos obtuvieron valores extremos de 6 y 25 gamas por 100 cc. de plasma y una media aritmética de 15.0. Aunque ligeramente por encima de las cifras comunicadas por Corral, Gómez Mont y col.³ quienes al utilizar el método original de Porter-Silber encontraron de 4 a 20 gamas (promedio 9.5) en la mujer y de 5 a 21 gamas en el hombre (promedio 10).

La respuesta al H. A. C. T. ha sido utilizada por muchos investigadores para la medición de la función adrenocortical desde su introducción por Thorn hace 11 años, y ha probado ser la prueba más eficiente. Los resultados obtenidos con estimulación con H. A. C. T. simple, nos permiten establecer una correlación entre la respuesta del grupo normal y el grupo con insuficiencia, ya que no fue posible encontrar algún caso con hiperfunción para establecer definitivamente la magnitud de la respuesta normal. Sin embargo creemos oportuno mencionar los hallazgos de Dyrenfurth y col.⁴ quienes no encontraron una diferencia importante en la respuesta al H. A. C. T. a las 4 horas, por vía intramuscular, en tres grupos de personas: normales; con S. de Cushing, y con S. de Virilismo. Únicamente a las 48 horas persistió la elevación de los corticoides plasmáticos en los enfermos con síndrome de Cushing, en comparación con el grupo normal en quienes descendieron después de 4 horas. Los mismos autores han empleado la prueba de estimulación para el diagnóstico diferencial entre hiperplasia y tumor suprarrenales, encontrando en la hiperplasia una respuesta exuberante, mientras que en casos de tumor no.

Pensamos que la prueba de estimulación con hormonas de acción lenta en dosis fraccionadas tiene gran utilidad cuando no se requiera un resultado

inmediato, o bien cuando se sospeche alguna respuesta falsa negativa por destrucción intravascular de la hormona. La magnitud de la respuesta con esta modalidad es comparable a la obtenida con hormona de acción rápida a las 3 horas; y demostró un incremento sincrónico con el descenso de los eosinófilos circulantes.

La respuesta obtenida con la prueba de 8 horas por vía endovenosa es muy pobre, y refleja una insuficiencia suprarrenal subclínica, que necesariamente habrá que confirmar con estímulos mayores.

Los valores fraccionados encontrados en la enferma adrenalectomizada, demuestran que después de la administración oral de cortisol, la concentración máxima en el plasma ocurre dentro de la primera hora, lo que sugiere que la absorción tiene lugar en el estómago, o en la parte superior del intestino delgado.^{5, 6} A las 7 horas, la cifra encontrada de 3 gamas puede significar la base para medir los intervalos a que se debe administrar la dosis fraccionada, para obtener una concentración plasmática constante.

Finalmente, creemos que entre los diferentes procedimientos que han sido empleados para estudiar la función corticosuprarrenal, la cuantificación de los corticoides plasmáticos, y antes y después de estimulación, constituyen una prueba práctica, específica, que puede realizarse en el término de 5 horas, y al alcance de la clínica; de gran valor para el diagnóstico de la insuficiencia suprarrenal subclínica, al proporcionar una medida bastante precisa de la reserva funcional, y evita las colecciones urinarias de 24 horas en ocasiones tan difíciles de llevar correctamente.

RESUMEN

Se describe el método de Porter-Silber con la modificación de Peterson y col. para la cuantificación de los esteroides con cadena lateral de 17, 21, dihidroxi-20 cetona, en el plasma sanguíneo, y la eficiencia del mismo en nuestras manos al emplearlo en la determinación de los valores normales de un grupo de 71 personas de ambos sexos con edades comprendidas entre 20 y 40 años; en quienes se encontró una media de 16.19% y desviación "standard" de 9.12 gamas.

Se comunican los resultados obtenidos con la prueba de estimulación con corticotrofina en sus diversas modalidades, en personas normales y en pacientes con insuficiencia corticosuprarrenal.

Finalmente se insiste en la utilidad de la determinación de los corticoides en plasma, en la medición de la reserva funcional de la corteza suprarrenal.

REFERENCIAS

1. Peterson, R. E.; Parker, A., y Guerra, S. L.: *Evolution of Silber-Porter procedure for determination of plasma hydrocortisone*. Am. Chem. Vol. 29, 144, enero, 1957.
2. Silber, R. H., y Porter, C. C.: *The determination of 17, 21, Dihydroxy-20 ketos-*

- teroids in urine and plasma.* The J. of Biol. Chem. Vol. 210. N° 2, 923-932, octubre, 1954.
3. Corral, G. J.; Alamilla, M.; Galván, C., y Gómez Mont F.: *Determinación de 17, 21, Dihidroxi-20-Cestosteroides en orina y en plasma, para el método de Porter-Silber.* Rev. de Inv. Clínica. Vol. XI, N° 3, pp. 379-393, julio-septiembre, 1959.
 4. Dyrenfurth, I.; Blair, A. J.; Beck, J. C., y Venning, E. H.: *Studies in patients with adrenocortical hyperfunction.* The J. of Clin. End. and Met. Vol. 20, N° 5, 735-749, marzo, 1960.
 5. Nelson, D. H.; Sandberh, A. A.; Palmer, J. G., y Tyler, F. H.: *Blood levels of 17-OH following the administration of adrenal steroids.* J. Clin. Inv. Vol. 31, 843, 1952.
 6. Abelson, D., y Borches, D. A.: *Plasma cortisol level in man following oral and intravenous administration of cortisol.* J. of Clin. End. and Met. Vol. 19, N° 2, 219-223, febrero, 1959.
 7. Vogt, N.: *The output of cortical hormone by the mammalian suprarenal.* J. Physiol. 102-341-356, 1943.
 8. Corcoran, A. C. y Page, I. H.: *Method for the chemical determination of corticosteroids in urine and plasma.* J. Lab. and Clin. Med. Vol. 33, 1326-133, 1948.
 9. Nelson, D. H., y Samuels, L. T.: *A method for the determination of 17-Hydroxy-Corticosteroids in blood; 17-Hydroxicorticosteroids in the peripheral circulation.* J. Clin. End. and Met. Vol. 21, 519-526, 1952.

DETERMINACION DE CORTICOIDES EN PLASMA SANGUINEO

COMENTARIO AL TRABAJO DEL DR. FRANCISCO DURAZO

DR. FRANCISCO GÓMEZ MONT

EL TRABAJO de los Dres. Durazo, Paullada y Luna del Villar es muy importante porque pone de manifiesto un progreso más en las técnicas para la medición de corticoides plasmáticos. En efecto, el uso de un solvente como el diclorometano, menos polar que el cloroformo, permitirá una extracción más fácil de los corticoides por el reactivo de Silber y Porter. Sin embargo esta menor polaridad no disminuye la habilidad para la extracción de los corticoides libres del plasma del sobrante. Este conjunto de características permiten usar volúmenes más pequeños de sangre ya que por los métodos originales debían de extraerse de 50 a 60 ml, mientras que en los actuales como el descrito por el Dr. Durazo, son suficientes 10 a 12 cc. Una muestra de la eficiencia de esta variación, lo dan las cifras de valores normales. Los descritos inicialmente por Silber y Porter, usando el cloroformo como solvente de extracción, oscilaban alrededor de 10 microgramos por 100 ml de plasma en manos de distintos autores, mientras que con la técnica aquí descrita los valores de 16 microgramos que encuentra el Dr. Durazo cuando se usa la extracción con diclorometano. Esta recuperación de más de un 50 por ciento es apreciable porque aumenta la sensibilidad del procedimiento. Sin embargo en el análisis de la técnica que describe el Dr. Durazo, vale la pena mencionar dos factores que pueden aumentar, por las características del método empleado, los valores de corticoides plasmáticos. El primer factor es el uso de volúmenes tan pequeños de plasma, ya que según la técnica descrita se colocan en el colorímetro cantidades de corticoides contenidos en 3 cc. de plasma, o sea, un cincuentavo de los 100 ml de plasma en que se va a reportar el resultado. Segundo: los métodos anteriores extraían los corticoides contenidos en 10 cc. de sangre, o sea en 1/10 del volumen de plasma que se usa como *standard* para dar el resultado final. Es posible que los errores

inherentes a estos micrométodos al multiplicarse por cinco veces más aumenten los valores, no por una mejor recuperación sino por una característica del método empleado. Otro comentario que conviene hacer es el relativo a la corrección de cromógenos aplicando el método de Allen. Esta corrección que ha demostrado ser tan útil en los micrométodos para dosificación de sustancias esteroides, disminuyendo la intensidad de colores espúreos, permitiría disminuir el error que da el uso de cantidades tan pequeñas de plasma y además permitiría también usar volúmenes más pequeños de sangre, ya que aplicando este sistema es necesario emplear sólo un 40 a un 50 por ciento de la sangre.

Los resultados obtenidos en la clínica confirman ampliamente la validez del método y son semejantes a nuestra experiencia. Sin embargo, quisiéramos insistir solamente en la preferencia que hemos dado en nuestro trabajo al uso de la prueba de estimulación suprarrenal con el uso de hormona adrenocorticotrófica de acción lenta y leyendo la respuesta a las cuatro horas. En estas condiciones obtenemos una respuesta más estable que con la hormona de acción rápida y como dice el Dr. Durazo aceleramos la respuesta de la prueba, ya que puede tenerse un resultado preciso sobre la reserva suprarrenal de un sujeto en un lapso no mayor.