

HORMONA DE CRECIMIENTO

I

RADIOINMUNOENSAYO

ADALBERTO PARRA-COVARRUBIAS¹

Se describe brevemente el principio básico del radioinmunoensayo y se definen algunos vocablos técnicos utilizados con frecuencia.

El análisis de las características del radioinmunoensayo de hormona de crecimiento, demuestra que la sensibilidad del sistema va de 1.5 a 25.0 nanogramos por mililitro de plasma sanguíneo (ng/ml); los porcentajes de recuperación variaron entre 90.6 y 95.1; la precisión o variabilidad intraensayo fue de 0.5 a 0.9 ng/ml para niveles de hormona de crecimiento de 0.0 a 6.2 ng/ml y de 2.2 a 3.3 ng/ml para niveles entre 12.5 y 25.0 ng/ml. La reproducibilidad de los resultados o variabilidad interensayo fue de 0.6 y 7.5 ng/ml para niveles bajos y altos de hormona de crecimiento, respectivamente. El análisis de diferentes volúmenes de plasma de una misma muestra, dio como resultado una excelente correlación lineal.

CON EL ADVENIMIENTO de la técnica general del radioinmunoensayo se obtuvo un gran avance en el campo de la endocrinología. Dicha técnica hizo posible no sólo el medir las concentraciones plasmáticas de una hormona

Los valores plasmáticos de hormona de crecimiento en niños y adolescentes normales, en ayunas y en respuesta a la administración endovenosa de L-arginina. Dichos valores disminutos en la literatura extranjera. Los niveles plasmáticos basales de hormona de crecimiento en una paciente con anorexia nerviosa, fueron superiores a 40 ng/ml y permanecieron elevados durante la administración endovenosa de L-arginina. Dichos valores disminuyeron considerablemente durante la etapa de recuperación de la paciente, durante la cual, hubo un aumento progresivo en el peso corporal.

En los tres pacientes con hipopituitarismo orgánico, los niveles plasmáticos de hormona de crecimiento en respuesta a la infusión de L-arginina, fueron mínimos o no detectables. (Gac. Méd. Méx. 101: 591, 1971).

proteica en un momento determinado, sino también comprender mejor la fi-

¹ División de Nutrición, Departamento de Investigación Científica, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social.

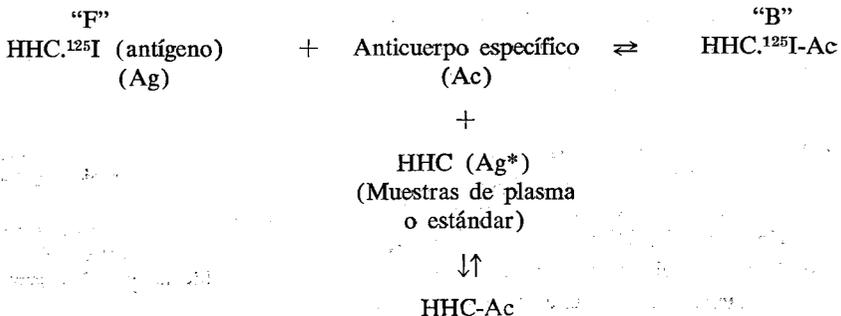
siología de estas hormonas y aún, llegar a estimar la tasa de secreción en 24 horas de algunas de estas hormonas.

En 1960 Yalow y Berson describieron por primera vez los principios generales del radioinmunoensayo.¹ A partir de entonces, se han hecho numerosas variaciones específicas para medir una gran cantidad de hormonas proteicas.²⁻⁸

En el presente artículo, no se pretende hacer una revisión exhaustiva de los principios generales del radioinmunoensayo de hormonas proteicas, puesto que existen en la literatura médica un gran número de ellas.^{8, 9} Solamente, se desea hacer una presentación y el análisis de las características del radioinmunoensayo para dosificar la hormona humana de crecimiento (HHC), que utilizamos en nuestro laboratorio, así como algunos resultados sobre las variaciones fisiológicas en las concentraciones plasmáticas de esta hormona.

El principio general del radioinmunoensayo se puede resumir fácilmente en dos reacciones de tipo competitivo:

La HHC marcada con el radioisótopo (Ag) se une al anticuerpo específico (Ac), para formar un complejo radioactivo antígeno-anticuerpo (HHC. ¹²⁵I-Ac). El radioinmunoensayo, se basa en la capacidad que tiene la HHC (Ag*) (no marcada con radioisótopos) presente en el plasma o en la solución estándar, para competir con la HHC radioactiva por el anticuerpo específico y por lo tanto, inhibir su unión con dicho anticuerpo. Como consecuencia de esta inhibición competitiva, la proporción entre HHC ¹²⁵I unida al anticuerpo (B) y la HHC ¹²⁵I no unida a dicho anticuerpo (F) —que se expresa como B/F— va disminuyendo, conforme va aumentando la concentración de HHC en el plasma o en la solución estándar; por lo tanto, se puede tener una serie de soluciones estándar con concentraciones variables de HHC y ver el desplazamiento que sufre la fracción B/F. En esta forma se construye la curva estándar (Fig. 1). La concentración de HHC en una muestra de plasma que se desea analizar, se obtiene al comparar la inhibición que dicho plas-



ma ocasionó entre la unión de la HHC ^{125}I y el anticuerpo específico (B/F), con la obtenida por las soluciones estándar que contienen concentraciones conocidas de HHC.

Definición de términos

Yodación: La mayoría de las hormonas peptídicas tienen cuando menos un residuo tirosina, el cual puede ser "marcado" con yodo radioactivo. La

razón por la cual se usa yodo radioactivo en lugar de otros radioisótopos (carbón 14 o tritium), es que con el primero, se obtiene una actividad específica elevada, necesaria para los fines particulares del radioinmunoensayo. El método más comúnmente usado para la yodación de hormonas proteicas es el descrito por Greenwood y Hunter.¹⁰ La yodación debe restringirse a un átomo de yodo por cada molécula de la hormona.

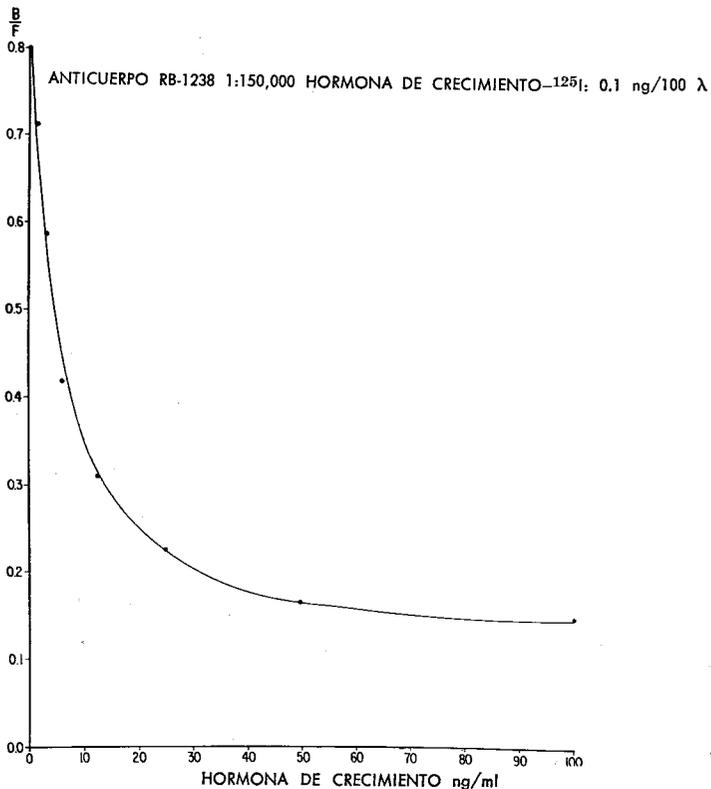


Fig. 1. Curva estándar en papel aritmético. Cada punto representa el promedio de cada una de las concentraciones de HHC analizadas por triplicado.

Actividad específica: Este término se refiere a la proporción de la hormona proteica que se ha vuelto radioactiva, como consecuencia de la yoda-

nuto / unidad de masa o bien, como curies o microcuries / unidad de masa.

Daño: Indica la proporción de moléculas de la hormona proteica, que

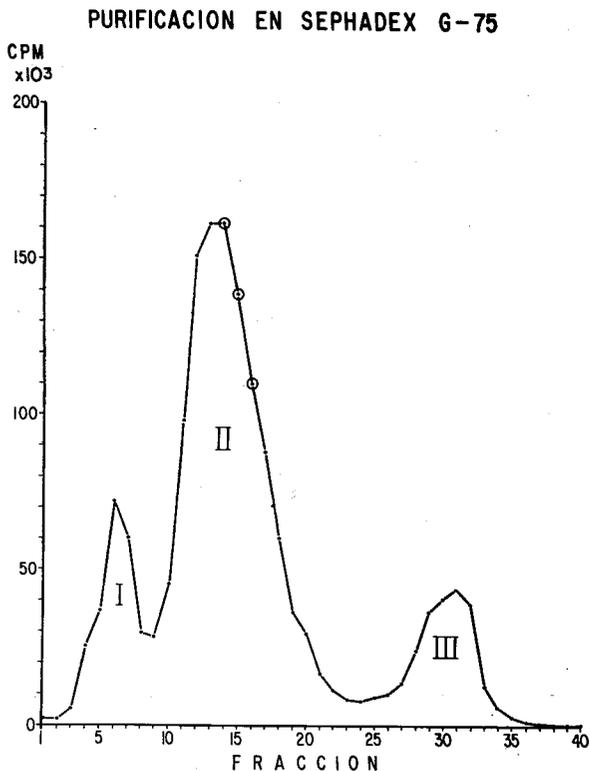


Fig. 2. Gráfica de radioactividad obtenida al purificar HHC ^{125}I en Sephadex G-75. El área I representa las fracciones que contienen la HHC. ^{125}I con mayor daño. El área II representa las fracciones con HHC. ^{125}I con menor daño y mayor antigenicidad. El área III representa las fracciones que contienen el ^{125}I libre. Las fracciones con menos daño y mayor antigenicidad que se usan para el radioinmunoensayo, son las marcadas como \circ en el área II.

ción. Una gran actividad específica se correlaciona con una gran radioactividad. La actividad específica se puede expresar como cuentas por mi-

han sido alteradas durante el proceso de la yodación, y que se comportan como si ya estuvieran unidas al anticuerpo. Este daño puede ser ocasio-

nado por la radiación interna del yodo radioactivo o por un exceso cuantitativo del agente oxidante.

Eficiencia: Se refiere a la proporción en que el yodo radioactivo se ha unido a la hormona proteica. Por ejemplo: una eficiencia del 70%, significa que la mayor parte del yodo

proteica radioactiva unida al anticuerpo. Hay diferentes métodos para separar esta fracción: a) Cromatoelectroforesis en papel: la fracción "B" se localiza en el extremo opuesto al sitio de aplicación de la muestra; b) Doble anticuerpo: la fracción "B" se encuen-

ANTICUERPO RB-1238 1:150,000 HORMONA DE CRECIMIENTO-¹²⁵I: 0.1 ng/100 λ

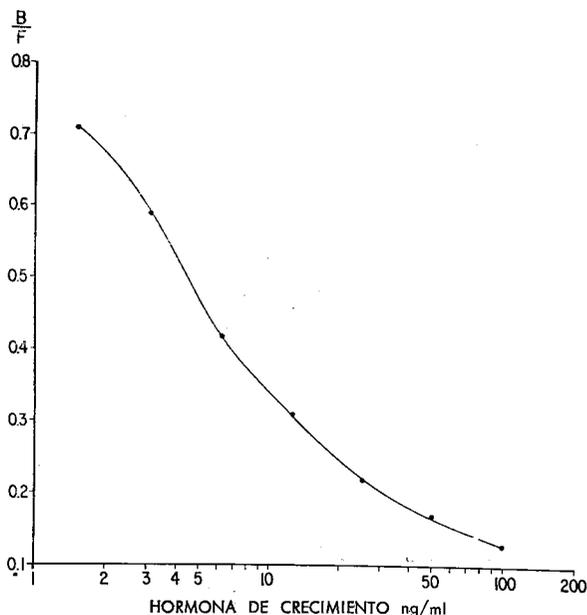


FIG. 3. Curva estándar en papel semilogarítmico. Cada punto representa el promedio de cada una de las concentraciones de HHC analizadas por triplicado.

radioactivo se ha unido a la hormona, al final de la reacción; por lo tanto, la hormona así marcada, tendrá una elevada actividad específica y por lo mismo, un gran número de cuentas por minuto.

Fracción unida (B): Hace referen-

tra en el precipitado; c) Carbón-dextrán: la fracción "B" se localiza en el sobrenadante.

Fracción libre (F): Es la proporción de hormona proteica radioactiva, que no se ha unido al anticuerpo y que no está dañada. En la cromatoelec-

troforesis en papel, la fracción "F" se localiza en el origen; en el sistema de separación con doble anticuerpo, se encuentra en el sobrenadante; en el

este caso yodo 131 ó 125; b) Un anticuerpo específico; c) HHC purificada, para las soluciones estándar.

La HHC fue yodada de acuerdo con

ANTICUERPO RB-1238 1:150,000 HORMONA DE CRECIMIENTO- ^{125}I : 0.1 ng/100 λ

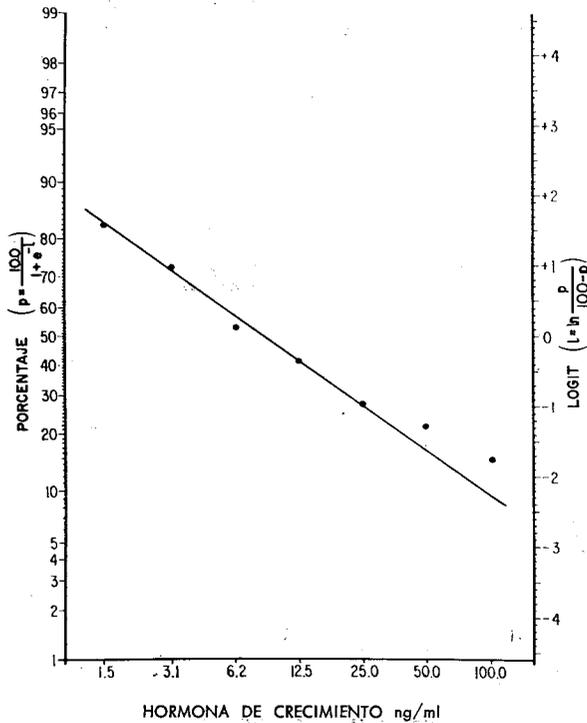


FIG. 4. Curva estándar en papel logit. Cada punto representa el promedio de cada una de las concentraciones de HHC analizadas por triplicado.

sistema de separación con carbón-dextrán, se localiza en el precipitado.

Material y métodos

El material esencial consiste en: a) HHC marcada con un radioisótopo,

el método de Greenwood y Hunter¹⁰ usando ^{125}I ,¹¹ a razón de un átomo del radioisótopo por molécula de HHC (Iso-Serve, Cambridge Nuclear Corporation, Billerica, Mass.) La actividad específica varió entre 100-130 microcuries por microgramos ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$),

con una concentración del radioisótopo de $100 \mu\text{Ci/ml}$ y una concentración de la hormona de $0.77\text{-}1.0 \mu\text{g/ml}$; la inmunoprecipitabilidad fue de 95% y el daño osciló entre 4.0 y 9.0 por ciento. Cuando el daño fue superior a

dante el uso de una suspensión de carbón-dextrán.¹³ La HHC ^{125}I se diluyó para obtener $0.100\text{-}0.125 \text{ ng/} 100 \mu\text{l}$, lo cual proporcionó entre $4,500\text{-}5,500$ cuentas por minuto (cpm).

CONTROL DE CALIDAD

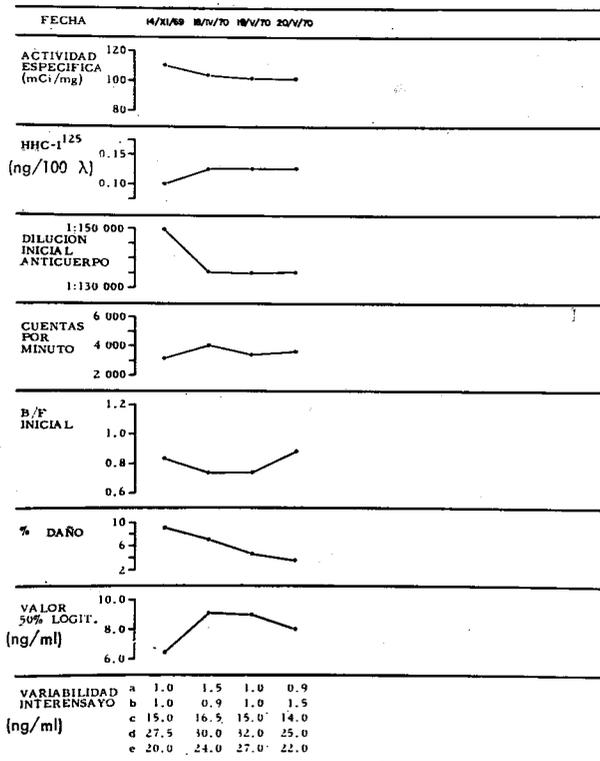


FIG. 5. Parámetros indispensables que deben analizarse en la hoja de control de calidad. Cada punto representa las características del radioinmunoensayo, realizado en la fecha indicada en la parte superior de la gráfica.

6%, la HHC ^{125}I se purificó en una columna de Sephadex G-75 y se utilizó la fracción más antigénica, y con menos daño (Fig. 2) identificada me-

El anticuerpo (R-B-1238)¹ se obtuvo inmunizando conejos con HHC

¹ El anticuerpo fue obsequio del Dr. Robert M. Blizzard (Pediatric Endocrine Clinic, The Johns Hopkins Hospital).

obtenida mediante el método de Wilhelmi y se utilizó en una dilución inicial de 1:150,000.

Las curvas estándar se prepararon usando HHC Wilhelmi (HS1216-C.)² La concentración inicial fue de 100 ng/ml y mediante diluciones sucesivas (1:1) con albúmina bovina al

μ l) y 0.1 ml de la dilución inicial del anticuerpo (1:150,000), constituyendo un volumen final de incubación de 0.7 ml. Todas las muestras se incubaron a 4°C durante 5 días. Al final del período de incubación, se agregaron 3.0 ml de una suspensión de carbón-dextrán¹² a cada uno de los tubos

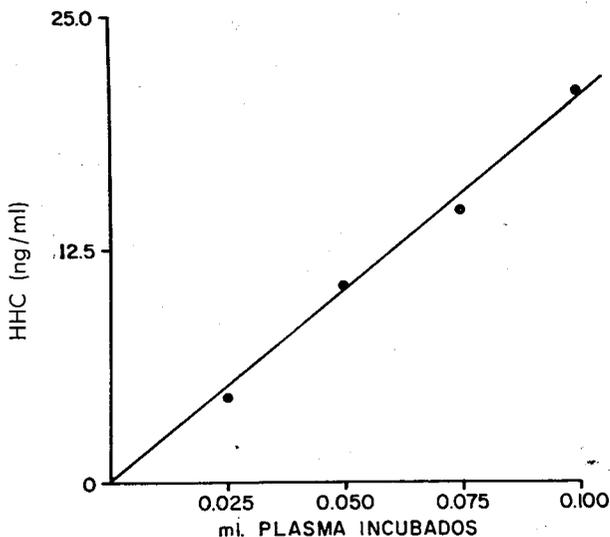


Fig. 6. Concentraciones de HHC en una misma muestra de plasma, cuando se analizan diferentes volúmenes de la misma.

5% en buffer de barbital (0.1M, pH 8.4-8.6) se obtuvieron las concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1 y 1.5 ng/ml.

Todas las curvas estándar se hicieron en triplicado, teniendo cada muestra 0.5 ml de la solución estándar, 0.1 ml de HHC. ¹²⁵I (0.100-0.125 ng/100

e inmediatamente después, se centrifugaron a 3,000 rpm durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada PR-6 (International Equipment Co. Needham Hts., Mass.). A continuación se separó el sobrenadante del precipitado y se contaron ambas fracciones por separado durante dos minutos en un contador automático de centelleo para radiaciones gama (Mo-

² La HHC purificada fue proporcionada por el Dr. A. E. Wilhelmi a través de la National Pituitary Agency, U.S.A.

laron entre 7.8 y 17.6 años. Se les administró monoclóruo de L-arginina (0.5 g/kg peso corporal) por vía endovenosa, en forma de una solución acuosa al 10%,* durante un lapso de 30 minutos. Se tomaron muestras de

vosa según el criterio de Bruch.¹⁵ A su ingreso al hospital (29-VII-69) se le administró L-arginina en la forma ya mencionada. Dicha prueba se repitió durante la etapa de recuperación cuando la paciente había tenido un

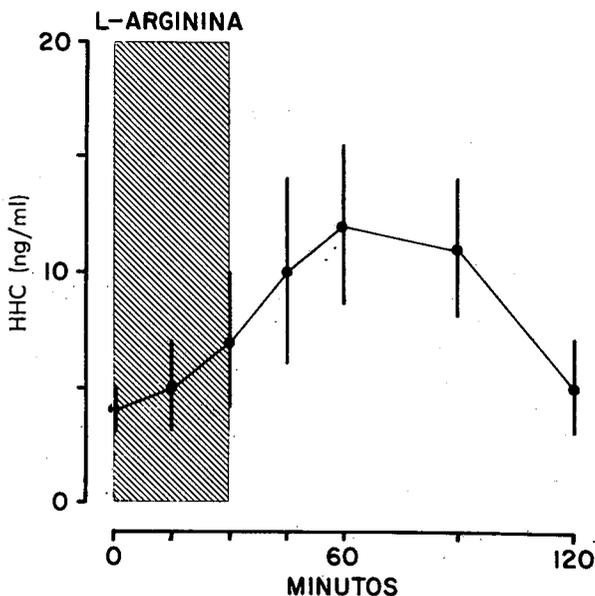


Fig. 8. Valores plasmáticos de HHC en un grupo de 8 niños y adolescentes normales, durante la curva de tolerancia a la arginina endovenosa (0.5 g/kg peso). El área sombreada representa el tiempo que duró la infusión de L-arginina (Promedio \pm error estándar).

sangre heparinizada a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.

c) Se estudió una paciente del sexo femenino de 30 años de edad, con diagnóstico clínico de *anorexia ner-*

aumento de 9 y 15 kg de peso corporal (26-IX-69 y 6-IX-69), respectivamente).

d) A tres pacientes con panhipopituitarismo orgánico (un hombre y dos mujeres), se les administró en forma secuencial, monoclóruo de L-arginina e insulina. La prueba se realizó en la siguiente forma: después de

* La L-arginina fue proporcionada gratuitamente por Sica, S. A. México, D. F. y la solución acuosa al 10% fue procesada y envasada por Abbott Laboratories de México.

un período testigo de 30 minutos, se administraron por vía endovenosa 0.5 g/kg peso corporal de monoclóruo de L-arginina (tiempo 0) en forma de una solución acuosa al 10%; dicha

Durante las dos horas que duró la prueba se tomaron muestras de sangre heparinizada cada 15 minutos.

Todas las muestras de sangre para estos estudios, se centrifugaron inme-

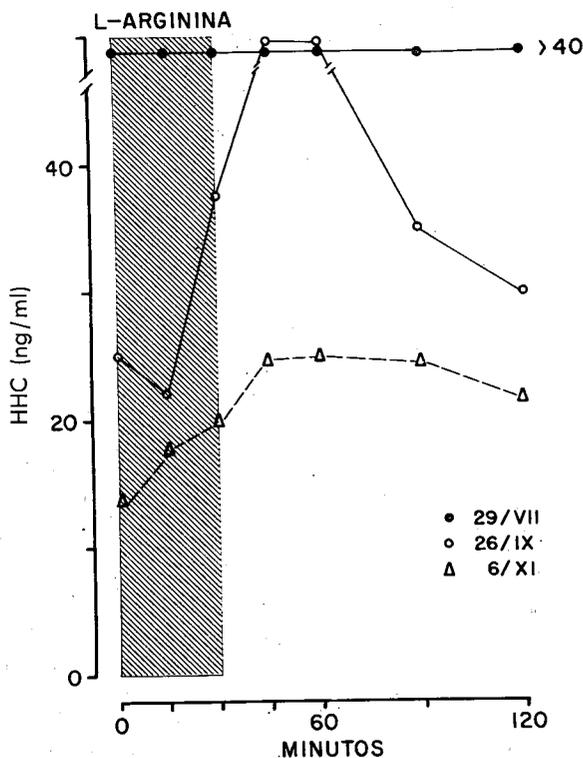


FIG. 9. Cambios en los valores plasmáticos de HHC en una paciente con anorexia nervosa, estudiada durante varios meses. Ingreso al hospital (●), dos meses después, cuando su peso corporal había aumentado en 9 kg (○) y cuando había aumentado 15 kg en peso corporal (Δ).

infusión duró 30 minutos. A los 60 minutos de haberse iniciado la administración de L-arginina, se aplicó rápidamente por vía endovenosa, insulina, de acción rápida 0.1 U/kg peso.

diatamente después de haberse obtenido y el plasma se separó y se congeló a -20°C para su análisis posterior. Las muestras de plasma se analizaron en duplicado.

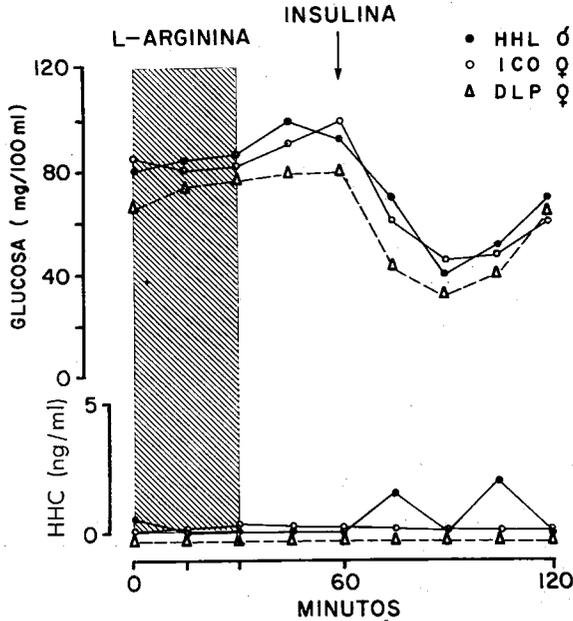


Fig. 10. Concentraciones plasmáticas de HHC y de glucosa en tres pacientes con panhipopituitarismo orgánico, durante la curva de tolerancia a la L-arginina y a la insulina endovenosa. El área sombreada representa el tiempo que duró la infusión de L-arginina. La flecha indica el momento en que se administró la insulina.

Los valores que se expresan en el texto, representan el promedio error \pm estándar.

Resultados

Curva estándar: Como puede observarse en la figura 1, en la primera mitad de la curva, se obtuvo un descenso muy rápido en la fracción B/F. De tal forma, que hubo un descenso del 50% a una concentración de HHC de 8.5 ng/ml.

Sensibilidad: Por los resultados que se muestran en las figuras 3 y 4, se puede observar que el sistema es

sensible para concentraciones de HHC que oscilan entre 1.5 y 25.0 ng/ml.

Recuperación: En la tabla I se puede observar que las recuperaciones variaron entre 90.6 y 95.1 por ciento, de acuerdo con las diferentes concentraciones de HHC que se analizaron.

Precisión o variabilidad intraensayo: La variabilidad intraensayo se investigó analizando una misma concentración de HHC en diez muestras diferentes, en un mismo radioinmunoensayo. Los resultados demuestran que la variabilidad intraensayo osciló de 0.5 a 3.3 ng/ml para las diferentes concentra-

TABLA I
ESTUDIOS DE RECUPERACION

Plasma (μ l)	HHC ng/ml	Resultado (ng/ml)		Recuperación (por ciento)
		Teórico	Real	
50	—	—	6.0	—
50	1.5	6.0 + 1.5 = 7.5	6.8	90.6
50	3.1	6.0 + 3.1 = 9.1	8.5	93.4
50	6.2	6.0 + 6.2 = 12.2	11.5	94.2
50	12.5	6.0 + 12.5 = 18.5	17.4	94.1
50	25.0	6.0 + 25.0 = 31.0	29.5	95.1

ciones de HHC que se estudiaron (Tabla II).

Reproducibilidad o variabilidad interensayo: La variabilidad interensayo se determinó en diversas muestras de plasma (en duplicado) con diferentes concentraciones de HHC, analizadas en ensayos realizados en diferentes días. Debido a que aún no se cuenta con un número grande de ensayos, no se calcularon las desviaciones estándar. En la parte inferior de la figura 5 se describen los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos.

Efecto de la dilución del plasma: Para tener una mayor seguridad de que lo que se está determinando en las muestras de plasma, es efectivamente HHC, se dosificaron los niveles de esta hormona en una misma muestra de plasma, tomando diferentes volúmenes de dicho plasma. Los resultados obtenidos permiten establecer con claridad una buena correlación lineal (Fig. 6).

Control de calidad: Con el objeto de tener un conocimiento longitudinal de la calidad del radioinmunoensayo,

TABLA II
VARIABILIDAD INTRAENSAYO

HHC ng/ml	Muestra										\bar{x}	D.S.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	1.0	0.5	0.0	0.5	0.4 ± 0.5	
3.1	2.0	1.7	4.5	3.5	3.1	3.1	4.0	2.5	4.0	3.5	3.2 ± 0.9	
6.2	6.0	6.5	8.0	5.0	6.2	7.5	6.0	7.0	5.5	6.2	6.4 ± 0.9	
12.5	10.0	11.5	11.5	15.0	12.0	12.5	17.5	12.0	15.0	12.5	13.0 ± 2.2	
25.0	22.5	25.0	26.0	22.5	22.5	30.0	26.0	25.0	30.0	20.0	25.0 ± 3.3	

es necesario tener un registro de las variaciones que sufren diferentes parámetros, a lo largo de varios meses. Dichos parámetros y sus variaciones en el curso de seis meses se presentan en la figura 5.

Valores basales de HHC en ayunas:

Se encontró una gran variación individual y los valores oscilaron de 0 a 12.5 ng/ml, siendo el valor promedio de 2.28 ± 0.4 ng/ml (Fig. 7). No se encontraron diferencias significativas entre individuos del sexo masculino y femenino.

Grupo normal: Los niveles plasmáticos de HHC tuvieron un marcado aumento en respuesta a la administración endovenosa de L-arginina. El valor máximo se obtuvo entre los 45 y 60 minutos (12.0 ± 3.6 ng/ml). A los 120 minutos, los valores plasmáticos habría descendido a niveles comparables con los de ayuno. (Fig. 8).

Anorexia nervosa: Al ingreso de la paciente, tanto los valores basales como los obtenidos en respuesta a la L-arginina, fueron superiores a 40 ng/ml. Posteriormente y coincidiendo con la recuperación clínica de la paciente, hubo un descenso tanto en los niveles basales, como en los obtenidos durante la infusión de L-arginina (Fig. 9).

Panhipopituitarismo: Ninguno de los pacientes tuvo cifras normales de HHC en plasma, a pesar de haberse obtenido una marcada hipoglucemia durante la segunda fase de la prueba. En dos de dichos pacientes, los niveles plasmáticos de HHC prácticamente fueron de 0.0 ng/ml.

Discusión

Las características que un radioinmunoensayo debe tener, varían ligeramente según las aplicaciones que se le quieran dar. Si se desean medir concentraciones altas de la hormona (por ejemplo, en extractos glandulares), es necesario tener una mayor precisión (o una menor variabilidad), aunque la sensibilidad para concentraciones bajas de dicha hormona, no sea muy buena. Sin embargo, cuando se desean medir concentraciones bajas de la hormona (como es el caso nuestro), es muy importante tener una gran sensibilidad y una buena reproducibilidad en los resultados.⁸ Las características del radioinmunoensayo para HHC que se describen en el presente artículo, permiten asegurar la existencia, no sólo de una gran sensibilidad, sino también, de una muy buena precisión y reproducibilidad.

El análisis de los resultados obtenidos en los diferentes grupos de individuos estudiados, permite afirmar que los valores basales de HHC en individuos normales, son similares a los comunicados por otros autores en el extranjero.^{16, 17} Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre individuos del sexo masculino y femenino, como ha sido descrito por Merimee.¹⁸

Los cambios en los niveles plasmáticos de HHC en respuesta a la administración endovenosa de L-arginina en el grupo normal, son en todo comparables a los descritos previamente en niños y adolescentes normales de edades comparables.¹⁶ La cifra máxi-

ma de 12.0 ± 3.6 ng/ml se obtuvo a los 60 minutos, es decir, 30 minutos después de terminada la infusión de L-arginina. No obstante el uso tan amplio de la L-arginina como estímulo para la secreción de HHC, hasta la fecha no existe una explicación satisfactoria respecto al mecanismo de acción involucrado.

Los niveles plasmáticos de HHC encontrados en la paciente con anorexia nervosa son similares a los informados en pacientes acromegálicos. Landon y colaboradores¹⁹ han encontrado en pacientes con *anorexia nervosa*, cifras de HHC similares a las descritas en este trabajo. Es interesante señalar que durante la etapa de recuperación clínica y coincidiendo con un aumento de 9 y 15 kg en el peso corporal, hubo una notable disminución, tanto en los niveles basales de HHC, como en los obtenidos en respuesta a la administración endovenosa de L-arginina. Este cambio es cualitativamente similar al observado en lactantes y preescolares con desnutrición proteico-calórica durante la etapa de recuperación.²⁰ Esta disminución en los niveles plasmáticos de HHC pudiera interpretarse como un fenómeno adaptativo en el metabolismo energético de estos pacientes, toda vez que al empezar a tener un mejor aporte calórico y proteico, disminuye la necesidad de movilizar las reservas energéticas propias del organismo.

La ausencia de niveles detectables de HHC en el plasma de los pacientes con hipopituitarismo orgánico, era perfectamente anticipable, dado que a

dos de ellos se les extirpó un craneofaringioma y al tercero un adenoma cromóforo de la hipófisis.

Los datos presentados en este artículo, confirman que el radioinmunoensayo para HHC, en nuestro laboratorio, tiene características que permiten asegurar que efectivamente se está dosificando HHC y no otra sustancia. Además, el grado de sensibilidad, precisión y reproducibilidad hacen de dicho sistema, un método útil no sólo para el diagnóstico de la deficiencia de dicha hormona, sino también para estudiar diferentes aspectos de la fisiología de la hormona humana de crecimiento.

REFERENCIAS

1. Yalow, R. S. y Berson, S. A.: *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man*. J. Clin. Invest. 39: 1157, 1960.
2. Schalch, D. S. y Parker, M. L.: *A sensitive double antibody immunoassay for human growth hormone in plasma*. Nature 203: 1141, 1964.
3. Catt, K.; Niall, H. D. y Tregear, G. W.: *A solid phase disc radioimmunoassay for human growth hormone*. J. Lab. Clin. Med. 70: 820, 1967.
4. Odell, W. D.; Wilber, J. F. y Paul, W. E.: *Radioimmunoassay of human thyrotropin in human serum*. J. Clin. Endocr. & Metab. 25: 1179, 1965.
5. Midgley, A. R., Jr.: *Radioimmunoassay: a method for human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone*. Endocrinology 79: 10, 1966.
6. Yalow, R. S.; Glick, S. M.; Roth, J. y Berson, S. A.: *Radioimmunoassay of human plasma ACTH*. J. Clin. Endocr. & Metab. 24: 1219, 1964.
7. Boyd, G. W.; Landon, J. y Peart, W. S.: *Radioimmunoassay for determining plasma levels of angiotensin II in man*. Lancet 2: 1002, 1967.
8. Berson, S. A. y Yalow, R. S.: *General principles of radioimmunoassay*. Clin. Chim. Acta 22: 51, 1968.
9. Berson, S. A.; Yalow, R. S.; Glick, S. M. y Roth, J.: *Immunoassay of pro-*

- tein and peptide hormones. *Metabolism* 13: 1135, 1964.
10. Greenwood, F. C. y Hunter, W. M.: *The preparation of ¹³¹I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity.* *Biochem. J.* 89: 114, 1963.
 11. Freedlander, A. E.: *Practical and theoretical advantages for the use of ¹²⁵I in radioimmunoassay.* Proc. Int. Symposium on Protein and Polypeptide Hormones. Excerpta Medica International Congress Series No. 161, 1968, p. 351.
 12. Herbert, H.; Lan, K. S.; Gottlieb, Ch. W. y Bliedcher, S. J.: *Coated charcoal immunoassay of insulin.* *J. Clin. Endocr. & Metab.* 25: 1375, 1965.
 14. Rodbard, D.; Rayford, P. L.; Cooper, J. A. y Ross, G. T.: *Statistical quality control of radioimmunoassay.* *J. Clin. Endocr. & Metab.* 28: 1412, 1968.
 15. Bruch, H.: *Anorexia nervosa and its differential diagnosis.* *J. Nerv. Mental. Dis.* 141: 555, 1965.
 16. Root, A. W.; Saenz-Rodríguez, C.; Bongiovanni, A. M. y Eberlein, W. R.: *The effect of arginine infusion on plasma growth hormone and insulin in children.* *J. Pediat.* 74: 187, 1969.
 17. Youlton, R.; Kaplan, S. L. y Grumbach, M. M.: *Growth and growth hormone. IV. Limitations of the growth hormone response to insulin and arginine and of the immunoreactive insulin response to arginine in the assessment of growth hormone deficiency in children.* *Pediatrics* 43: 989, 1969.
 18. Merimee, T. J.; Burgess, J. A. y Rabinowitz, D.: *Sex determined variation in serum insulin and growth hormone response to aminoacid stimulation.* *J. Clin. Endocr. & Metab.* 26: 791, 1966.
 19. Landon, J.; Greenwood, F. C.; Stamp, T. C. B. y Wynn, V.: *The plasma sugar, free fatty acid, cortisol and growth hormone response to insulin and the comparison of this procedure with other test of pituitary and adrenal function. II-In patients with hypothalamic or pituitary dysfunctional or anorexia nervosa.* *J. Clin. Invest.* 45: 437, 1966.
 20. Graham, G. G.; Cordano, A.; Blizzard, R. B. y Cheek, D. B.: *Infantile malnutrition: changes in body composition during rehabilitation.* *Pediat. Res.* 3: 579, 1969.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Robert M. Blizzard el haber proporcionado el anticuerpo específico para la hormona de crecimiento, al Dr. A. E. Wilhelmi de la National Pituitary Agency por haber enviado la hormona de crecimiento purificada que se usó como estándar y al Sr. Robert C. Ferris, Vicepresidente de Iso-Serve, Cambridge Nuclear Corporation, por haber obsequiado la HHC. ¹²⁵I. El monoclóruo de L-arginina fue donado gentilmente por el Sr. Rene Siggs, Gerente General de Sica, S. A. Reconocemos la gentil colaboración del Sr. Pedro Cattori, Gerente General de Control de Calidad de Abbott Laboratories de México, en la elaboración y envase de la solución acuosa al 10% de monoclóruo de L-arginina. Agradecemos la ayuda secretarial de la Srita. Luz María Luna.