

Perfil de las concentraciones de corticotropina intacta y fragmento ACTH₁₋₂₄ en las pruebas de estimulación con tetracosáctida*

P. Alía¹, E. Sospedra¹, Y. Torres², C. Villabona², J. Soler², M.A. Navarro¹

Resumen

La prueba de estimulación con tetracosáctida (ACTH₁₋₂₄) permite valorar la capacidad de las glándulas suprarrenales para producir cortisol. Sin embargo, en el estudio de la insuficiencia suprarrenal secundaria, no existe acuerdo sobre la dosis de ACTH₁₋₂₄ que se debería utilizar, y hay poca información sobre la cinética de esta molécula durante las pruebas de estímulo, así como de la reactividad cruzada con ACTH₁₋₃₉ durante su cuantificación.

Nuestro objetivo fue describir el perfil de concentraciones plasmáticas de corticotropina intacta (ACTH₁₋₃₉) y del fragmento ACTH₁₋₂₄ en individuos sanos tras la inyección intravenosa de 250 µg (HDT) o de 1 µg (LDT) de ACTH₁₋₂₄.

Se obtuvieron muestras de 10 voluntarios antes del estímulo, y a los 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. La concentración de ACTH₁₋₂₄ se determinó por radioinmunoanálisis, y la de ACTH₁₋₃₉ por enzoinmunoanálisis de quimioluminiscencia. Además, se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) y los tiempos de residencia media (MRT), y se compararon las medianas obtenidas en las dos pruebas (HDT y LDT).

La concentración basal media de ACTH₁₋₂₄ fue 20,2 pmol/L, y la de ACTH₁₋₃₉ 2,88 pmol/L. Aunque el AUC y la concentración máxima de ACTH₁₋₂₄ fueron significativamente mayores en la HDT, el MRT fue significativamente menor.

La mayor velocidad de eliminación de ACTH₁₋₂₄ en la HDT parece contrarrestar la influencia de la mayor concentración tras el estímulo, por lo que podría explicar las diferencias poco concluyentes entre HDT y LDT encontradas en la literatura.

Palabras clave: estimulación con tetracosáctida, corticotropina, insuficiencia suprarrenal.

Summary. Profile in concentrations of corticotropin and ACTH₁₋₂₄ fragment in tetracosactide stimulation tests

Stimulation test with tetracosactide (ACTH₁₋₂₄) allows us to assess the ability of adrenal glands for cortisol production. However, in the study of secondary adrenal insufficiency, no agreement exists about the dose of ACTH₁₋₂₄ and there are few data about the kinetics of this molecule during stimulation tests, as well as about its cross-reactivity with ACTH₁₋₃₉ during its measurement.

Our aim was to describe the profile of ACTH₁₋₂₄ and ACTH₁₋₃₉ concentrations in healthy subjects after i.v. injection of 250 µg (High Dose Test, HDT) or 1 µg (Low Dose Test, LDT) of ACTH₁₋₂₄.

Samples were obtained from 10 volunteers before the stimulus and after 5, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 minutes. ACTH₁₋₂₄ was measured by radioimmunoassay and ACTH₁₋₃₉ by chemoluminescent enzyme immunoassay. Area under the curve (AUC) and mean residence time (MRT) were also measured, and medians for both tests (HDT and LDT) were compared.

Mean basal concentrations were: for ACTH₁₋₂₄ 20,2 pmol/L, and for ACTH₁₋₃₉ 2,88 pmol/L. Though AUC and maximum concentration were significantly higher in HDT, MRT was significantly lower.

The lower residence time in HDT seems to offset the higher concentration after the stimulus, and this could explain the inconclusive differences between HDT and LDT found in the literature.

Key words: tetracosactide stimulation, corticotropin, adrenal insufficiency.

INTRODUCCIÓN

Conocer el estado del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales es de gran importancia, dado que una disfunción de este eje puede comprometer la supervivencia del paciente. De entre todas las pruebas diagnósticas utilizadas para este fin, la de la hipoglucemia insulínica (HI) es la considerada como de referencia, puesto que informa de la integridad del eje. Sin embargo, se trata de una prueba que requiere supervisión médica y no puede llevarse a cabo en todos los casos (por ejemplo, si el paciente es de edad avanzada, si ha tenido un accidente vascu-

lar cerebral, epilepsia o cardiopatía isquémica) (1). Por este motivo, se han propuesto pruebas funcionales que ofrezcan una información suficiente para el diagnóstico de la insuficiencia suprarrenal, y no tengan los inconvenientes de la hipoglucemia insulínica.

Hasta ahora, la prueba más ampliamente utilizada en su lugar ha sido la estimulación con dosis alta (HDT, del inglés «high-dose test») de 250 µg de tetracosáctida (ACTH₁₋₂₄). En la mayoría de los casos, existe una buena correlación entre la concentración del cortisol en el minuto 30 tras la estimulación y la concentración máxima de cortisol en la hipoglucemia insulínica (2). Sin embargo, está descrito un no despreciable porcentaje de falsos negativos, especialmente en casos de insuficiencia suprarrenal secundaria parcial (3). Dado que esta enfermedad puede tener potencialmente graves consecuencias si no se detecta, es prioritario utilizar pruebas diagnósticas de alta sensibilidad. Algunos autores consideran que la prueba de estimulación con dosis baja (LDT, del inglés «low-dose

¹Sección de Bioquímica Hormonal y Génica (Servicio de Bioquímica Clínica).

²Servicio de Endocrinología. IDIBELL. Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine y el XXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrados en Barcelona del 1 al 5 de junio de 2003.

test»), con 1 µg de tetracosáctida, tiene una mayor sensibilidad diagnóstica que el HDT en la detección de este tipo de insuficiencia suprarrenal (4-7), aunque otros cuestionan esta conclusión (8).

En la prueba de hipoglucemia insulínica se suelen medir las concentraciones de cortisol sérico y corticotropina plasmática. Sin embargo, en las pruebas de estimulación con ACTH₁₋₂₄ sólo se suelen medir las de cortisol. Por tanto, existe poca información acerca del perfil de concentraciones de ACTH durante este tipo de prueba, especialmente en cuanto a si hay diferencias en las concentraciones que se mantienen a lo largo de la prueba según la estimulación sea con cantidades mayores (HDT) o menores (LDT) de tetracosáctida. Así pues, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el perfil de las concentraciones de ACTH₁₋₂₄ y ACTH₁₋₃₉ tanto en la HDT como en la LDT en individuos sanos, de manera similar a lo que se hace con la medición de ACTH₁₋₃₉ en la prueba de hipoglucemia insulínica, así como describir la dinámica de eliminación del tetracosáctida.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en 10 voluntarios sanos (5 hombres y 5 mujeres) sin antecedentes de enfermedades granulomatosas, fúngicas, autoinmunes, endocrinas, psiquiátricas o neoplásicas, y que no tomaban ninguna medicación que pudiera interferir en la realización del estudio.

Los voluntarios fueron sometidos inicialmente a la estimulación con altas dosis, administrándose por vía endovenosa una ampolla (250 µg) de tetracosáctida (Synacthen®). Transcurrida al menos 1 semana, se llevó a cabo la estimulación con dosis baja, administrándose 1 µg de tetracosáctido, que se preparó de la siguiente manera: 1 mL de la ampolla de Synacthen® (250µg) se diluyó en 49 mL de solución de NaCl 9g/L; después, 1 mL de esta solución se diluyó en otros 49 mL más de solución de NaCl 9g/L; por tanto, 10 mL de la solución final contenían 1µg de tetracosáctida, y este volumen era el que se inyectaba al paciente. En ambos casos, las concentraciones plasmáticas de ACTH₁₋₃₉ y ACTH₁₋₂₄ se determinaron antes del estímulo y a los 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos tras la administración de tetracosáctida en ambas pruebas.

Las concentraciones de ACTH₁₋₃₉ se determinaron mediante enzoinmunoanálisis quimioluminiscente no competitivo en fase sólida en el analizador Immulite 2000 (Diagnostic Products Corporation, USA). Por su parte, la concentración plasmática de ACTH₁₋₂₄ o tetracosáctida se determinó mediante radioinmunoanálisis competitivo (DRG Diagnostics, Alemania) con una previa extracción de la muestra; en resumen: se diluye 1 mL de plasma con 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) al 1% y se hace pasar la mezcla por columnas SPEC-3ML-C18AR (SPEC®System), lavando 2 veces con 500 µL de TFA(1%) y otras dos veces con 500 µL de acetonitrilo al 60% (v/v con TFA al 1%); el eluato final se evapora y se resuspende en el tampón facilitado por DRG en el equipo de radioinmunoanálisis. El anticuerpo empleado reconoce los 24 aminoácidos N-terminales de la molécula de corticotropina, de manera que, en teoría, mide por igual ACTH₁₋₂₄ y ACTH₁₋₃₉. Por tanto, para ser rigurosos, teniendo en cuenta que, según el fabricante, el anticuerpo empleado para medir ACTH₁₋₃₉ presenta una reactividad cruzada de sólo 0,0001 con ACTH₁₋₂₄, se podría tomar como referente válido la concentración de ACTH₁₋₃₉ y sustraerla del valor de ACTH₁₋₂₄ para tener el valor

real de ésta; sin embargo, dada la gran diferencia entre los valores de ACTH₁₋₂₄ y los de ACTH₁₋₃₉, se consideró que la influencia de ACTH₁₋₃₉ sería despreciable, y los cálculos se han hecho directamente con las concentraciones de ACTH₁₋₂₄ obtenidas a partir de los valores del RIA, sin restar la concentración de ACTH₁₋₃₉.

Las áreas bajo la curva (AUC) y los tiempos de residencia media (MRT) de ACTH₁₋₂₄ en la circulación se calcularon utilizando el programa PKS® (Abbottbase Pharmacokinetic System). También se usó este programa para calcular los hipotéticos valores a tiempo cero tras la estimulación de cada individuo, extrapolando a partir de los datos de cada curva.

En cuanto a la metodología estadística, las concentraciones iniciales se expresan como media ± desviación estándar. Por otro lado, para evaluar la significación estadística de las diferencias observadas entre la estimulación con dosis baja y la estimulación con altas dosis, tanto en las concentraciones como en AUC y MRT, se empleó la prueba de Wilcoxon para datos apareados, adoptándose como significativo un valor $P < 0,05$. Los cálculos se realizaron mediante el programa *Analyse-it*.

RESULTADOS

Las determinaciones de la concentración de ACTH₁₋₂₄ se hicieron por duplicado, lo que sirvió para calcular el coeficiente de variación del procedimiento, utilizando como estimación de la desviación estándar la fórmula: $s = (\Sigma d^2/n)^{1/2}$, siendo d la diferencia entre los duplicados, y n el número total de determinaciones basales. Según esto, el CV resultó ser 14,4%. Por su parte, el CV del procedimiento de medida de la ACTH₁₋₃₉, para concentraciones del orden de las observadas en este estudio, era 5%.

La concentración inicial media de ACTH₁₋₂₄, calculada a partir de los 20 datos de los voluntarios, fue de $20,2 \pm 26,1$ pmol/L, y la de ACTH₁₋₃₉ fue de $2,88 \pm 1,11$ pmol/L. Sin embargo, existe una gran variación interindividual en la concentración de ACTH₁₋₂₄ (los valores mínimo y máximo fueron 0,38 y 98,3 pmol/L, respectivamente), con una mediana de 7,13 pmol/L (IC95%: 3,8-28,4 pmol/L). También existe una apreciable variabilidad intraindividual, a juzgar por las diferencias entre las concentraciones basales medidas para cada individuo antes de cada una de las pruebas, que se realizaron con una diferencia de al menos una semana. De hecho, la desviación estándar de estas determinaciones, que se asocia a la variación intraindividual, también se calculó mediante la fórmula $s = (\Sigma d^2/n)^{1/2}$, y el CV resultó ser de 91,5%.

En la tabla I se resumen los datos medianos de las concentraciones máximas de ACTH₁₋₂₄ y ACTH₁₋₃₉, que se observaron en la primera medida, a los 5 minutos, tanto en la estimulación con altas dosis como en la estimulación con dosis baja. Además, en la tabla se incluyen las áreas bajo la curva, que ofrecen información sobre el proceso evolutivo de la concentración a lo largo de la prueba. Se observaron diferencias significativas al comparar las concentraciones máximas (CM) y el área bajo la curva, tanto entre las dos pruebas ($P = 0,0003$ para CM y $P < 0,0001$ para el área bajo la curva) como entre ACTH₁₋₂₄ y ACTH₁₋₃₉ ($P = 0,002$).

Por lo que respecta a la cinética de eliminación del estímulo de ACTH₁₋₂₄, los tiempos de residencia media son muy variables entre los individuos estudiados. Las medianas de los MRT en ambas pruebas (ver también tabla I) fueron significativa-

Tabla I. Valores medianos (IC 95%) en las pruebas HDT y LDT

	HDT (250µg)		LDT (1 µg)	
	ACTH ₁₋₂₄	ACTH ₁₋₃₉	ACTH ₁₋₂₄	ACTH ₁₋₃₉
Concentración máxima (pmol/L)	1123 (386-4704)	18,4 (9,7-24,6)	78,5 (42-229)	2,2 (2,2-3,4)
AUC (pmol/L)·h	421 (144-1683)	5,8 (4,3-6,5)	50,9 (24,4-98,0)	3,3 (3,2-3,3)
MRT (h)	0,14	n.d.	0,37	n.d.

n.d.: no determinado, AUC: área bajo la curva, MRT: tiempos de residencia media

mente distintas ($P < 0,008$) para la estimulación con dosis baja (0,37 horas) y para la estimulación con altas dosis (0,14 horas).

En la figura 1 se pueden observar los perfiles de concentraciones medias de ACTH₁₋₂₄ y ACTH₁₋₃₉ obtenidos a lo largo de la prueba. El perfil de concentraciones de ambas ACTH fue casi paralelo, al menos en la estimulación con altas dosis, si bien las de ACTH₁₋₃₉ eran muy bajas o indetectables.

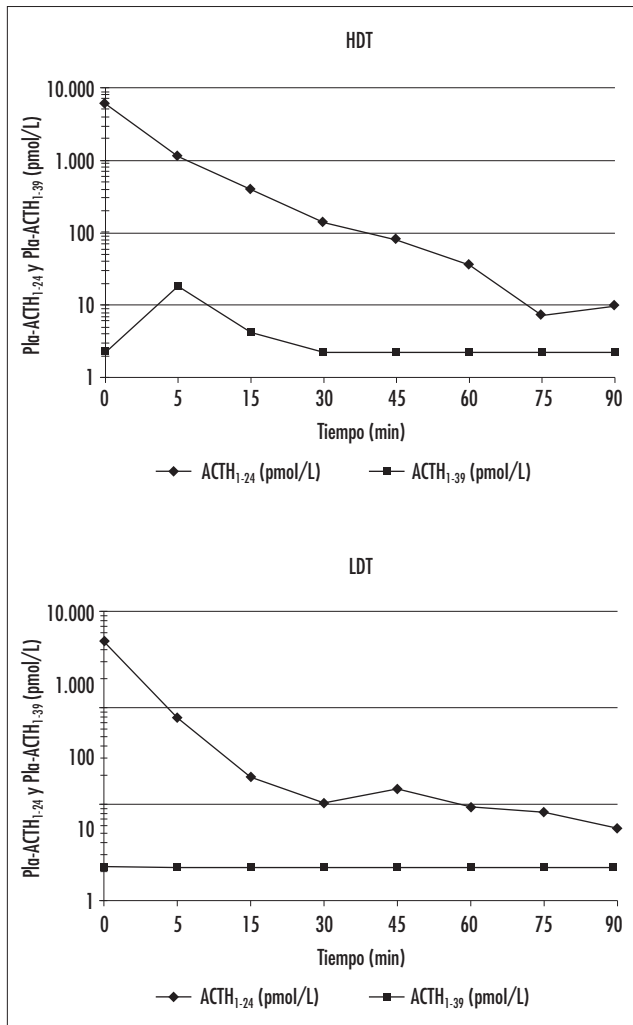


Figura 1 Perfil de las concentraciones medianas de ACTH₁₋₂₄ y ACTH₁₋₃₉ a lo largo de las pruebas de estimulación con dosis alta (HDT) y dosis baja (LDT) de tetracosáctida. La concentración a tiempo cero de ACTH₁₋₂₄ no es la mediana de las medidas basales, sino la calculada por el programa PKS mediante extrapolación a partir de los datos del resto de los tiempos.

DISCUSIÓN

Cuando la prueba de estimulación con tetracosáctida comenzó a utilizarse en el estudio de la insuficiencia suprarrenal secundaria, se administraban 250 µg de ACTH₁₋₂₄, que es la presentación comercial. Posteriormente, se han ido probando otras dosis (9-13), y en la actualidad no existe consenso acerca de cuál es el estímulo más adecuado para obtener resultados tan eficaces como los de la prueba de hipoglucemia insulínica (HI) (14, 15). Las cantidades más utilizadas habitualmente son 250 µg (*high dose test*) y aproximadamente 1 µg (*low dose test*).

En la prueba de hipoglucemia insulínica se suele medir la concentración de cortisol y corticotropina (ACTH₁₋₃₉), aunque algunos dudan de la utilidad de esta última (16). En las estimulaciones con tetracosáctida no se suele medir más que la respuesta de cortisol. Sin embargo, en el presente trabajo se planteó la medición, en voluntarios sanos, de las concentraciones tanto de ACTH₁₋₃₉ como la de ACTH₁₋₂₄ para tener una idea más clara de la situación que precede a la respuesta de cortisol: grado del estímulo, duración del mismo, dinámica de eliminación, etc.

En primer lugar, aunque no se ha publicado, en el conocimiento de los autores, un intervalo de referencia para las concentraciones de ACTH₁₋₂₄, sí se han hecho medidas de voluntarios sanos en diversos estudios (8,15), en que las medias estuvieron entre 1,5 y 2,8 pmol/L aproximadamente. En nuestro trabajo se ha observado que existe una gran variabilidad interindividual. Para poder cuantificarla se necesitaría un mayor número de casos que los estudiados aquí, sobre todo teniendo en cuenta la relativamente elevada imprecisión del procedimiento de medida utilizado ($CV=14\%$), según la aproximación llevada a cabo en el presente trabajo. También la variabilidad intraindividual parece elevada, según el cálculo aproximativo de nuestro estudio ($CV=91,3\%$).

Las concentraciones basales medias de ACTH₁₋₂₄ en los voluntarios analizados son superiores a las de ACTH₁₋₃₉, lo que parece indicar que esta forma molecular (que existe de manera natural en el organismo, junto con otras derivadas de la molécula de ACTH₁₋₃₉) es más frecuente que la propia corticotropina. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el anticuerpo utilizado para la determinación de ACTH₁₋₂₄ reconoce en realidad también la molécula de ACTH₁₋₃₉ (según el fabricante, con la misma reactividad). Por tanto, para ser rigurosos, se podría restar de la concentración de ACTH₁₋₂₄ la correspondiente a ACTH₁₋₃₉, medida con nuestro método habitual, considerando que dicha medida es la «real». Ahora bien, una vez realizada esta operación, hemos observado que, por lo que respecta a las concentraciones iniciales (antes de la administración de ACTH₁₋₂₄) los resultados no varían significativamente: sigue siendo mayor la de ACTH₁₋₂₄; y en cuanto a las

de los diversos tiempos, en su mayor parte la concentración de ACTH₁₋₃₉ puede considerarse despreciable en comparación con la de ACTH₁₋₂₄, que es mucho más elevada.

Todo esto se pone de relieve al observar el perfil de concentraciones de la figura 1. La concentración de ACTH₁₋₃₉ es en todo momento relativamente baja, cosa que parece razonable, dado que durante la prueba de estimulación con tetracosáctida se está suministrando al organismo un sustitutivo de la corticotropina. Sin embargo, se observa un pico de ACTH₁₋₃₉ justo en el primer punto de la curva (5 minutos), coincidiendo con la concentración máxima medida de ACTH₁₋₂₄. Este fenómeno sólo se percibe durante la prueba de estimulación con altas dosis, es decir cuando el estímulo es más grande. Puesto que no hay una razón fisiológica para este comportamiento de la corticotropina, este pico sugiere que existe una reacción cruzada en la medición de ACTH₁₋₃₉.

El análisis de la cinética de eliminación del fármaco, que ha permitido la determinación de los tiempos de residencia media (MRT), se ha realizado utilizando un modelo no compartimental. Aunque en algunos trabajos se establece que la eliminación de péptidos derivados de ACTH es bifásica (17), esto sucede en etapas muy tempranas tras la inyección (entre 1 y 5 minutos) por lo que en nuestro estudio pueden haberse perdido, ya que los primeros tiempos de recogida de muestra son 5 y 15 minutos. De hecho, la observación de la figura 1 muestra que existe una eliminación más o menos uniforme de ACTH₁₋₂₄ (aproximadamente hasta los 30 minutos tras la administración de tetracosáctida en el caso de la estimulación con dosis baja, y hasta los 75 minutos en el caso de la estimulación con altas dosis), hasta alcanzar las concentraciones iniciales. La concentración de ACTH₁₋₂₄ es mayor en la estimulación con altas dosis que en la estimulación con dosis baja en todos los tiempos. Sin embargo, se observa que a mayor concentración tras el estímulo, mayor velocidad de eliminación, sobre todo en los primeros momentos tras la inyección de tetracosáctida. Teniendo en cuenta que el resultado numérico de los tiempos de residencia media es muy dependiente del área bajo la curva en los primeros momentos, se deduce que, aunque en la prueba de estimulación con altas dosis el estímulo es mucho mayor, el tiempo de residencia media del ACTH₁₋₂₄ es significativamente más bajo que en la prueba de estimulación con dosis baja. Por tanto, al analizar la acción de la ACTH₁₋₂₄ sobre las glándulas suprarrenales, debe considerarse que la mayor velocidad de eliminación (menor tiempo de residencia media) en la estimulación con altas dosis podría contrarrestar la influencia de una mayor concentración inicial (en la estimulación con dosis baja ocurriría al revés).

Las concentraciones de ACTH₁₋₂₄ que se alcanzan en la estimulación con dosis baja son más que suficientes para provocar la estimulación de las glándulas suprarrenales de manera efectiva (11, 18). Esto explica que la respuesta de producción de cortisol sea similar en ambas pruebas hasta los 30 minutos (7, 8, 15, 19): en este momento, según nuestros datos en voluntarios sanos, la concentración de ACTH₁₋₂₄ llega al nivel inicial en la estimulación con dosis baja, mientras que en la estimulación con altas dosis, como esto no ocurre hasta los 75 minutos, la estimulación de las glándulas suprarrenales continúa, lo que genera las diferencias que se suelen observar en la respuesta de cortisol a tiempos superiores a 30 minutos.

La similitud en la respuesta de producción de cortisol en ambas pruebas que encuentran los diferentes autores referidos, así como la mayor sensibilidad diagnóstica de la prueba de

estimulación con dosis baja que aducen algunos (4-7), les sirven de base para preferir esta prueba como cribado en la sospecha de insuficiencia suprarrenal secundaria.

En resumen, aunque tras la inyección de ACTH₁₋₂₄ se alcanzan concentraciones en el plasma mucho más altas en la estimulación con altas dosis, las alcanzadas en ambas pruebas son suficientes para estimular al máximo las glándulas suprarrenales. El que el tiempo de residencia medio sea claramente menor en la estimulación con altas dosis (es decir, que se produce una eliminación más rápida) avala la impresión de que el estímulo estándar (250 µg) es excesivo e innecesario, dado el similar rendimiento de ambas pruebas que documentan diversos autores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Yolanda Armendáriz su ayuda en el estudio farmacocinético de la eliminación de ACTH₁₋₂₄.

Correspondencia:
Pedro Alía Ramos
Servicio de Bioquímica Clínica
(Sección de Bioquímica Hormonal y Génica)
Hospital Universitario de Bellvitge.
C/ Feixa Llarga s/n
08907 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona).
e-mail: palia@csub.scs.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Grinspoon S, Biller BMK. Laboratory Assessment of Adrenal Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:923-31.
2. Lindholm J, Kehlat H. Re-evaluation of the clinical value of the 30-minute ACTH test in assessing the hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1987;26:53-9.
3. Cunningham S, Moore A, McKenna J. Normal cortisol response to corticotropin in patients with secondary adrenal failure. *Arch Intern Med* 1983;143:2276-9.
4. Darmon P, Dadoun F, Frachebois C, Velut J-G, Boullu S, Dutour A, et al. On the meaning of low-dose ACTH(1-24) tests to assess functionality of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Endocrinol* 1999;140:51-5.
5. Broide J, Soferman R, Kivity S, Golander A, Dickstein G, Spier Z, et al. Low-dose adrenocorticotropin test reveals impaired adrenal function in patients taking inhaled corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1243-6.
6. Tordjman K, Jaffe A, Trostanetsky Y, Greenman Y, Limor R, Stern N. Low-dose (1 microgram) adrenocorticotrophin (ACTH) stimulation as a screening test for impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: sensitivity, specificity and accuracy in comparison with the high-dose (250 microgram) test. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;52:633-40.
7. Abdu T, Elhadd TA, Neary R, Clayton RN. Comparison of the low dose short synacthen test (1 microg), the conventional dose short synacthen test (250 microg), and the insulin tolerance test for assessment of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in patients with pituitary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:838-43.
8. Mayenknecht J, Diederich S, Bähr V, Plöckinger U, Oelkers W. Comparison of low and high dose corticotropin stimulation test in patients with pituitary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1558-62.
9. Graybeal M, Fang VS. Physiological dosing of exogenous ACTH. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985;108:401-6.
10. Dickstein G, Shechner C, Nicholson WE, Rosner I, Shen-Orr Z, Adawi F, et al. Adrenocorticotropin stimulation test: effects of basal cortisol level, time of day, and suggested new sensitive low dose test. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;72:773-8.
11. Crowley S, Hindmarsh PC, Holownia P, Honour JW, Brook CG. The use of low doses of ACTH in the investigation of adrenal function in man. *J Endocrinol* 1991;130:475-9.
12. Daidoh H, Morita H, Mune T, Murayama M, Hanafusa J, Ni H, et al. Responses of plasma adrenocortical steroids to low dose ACTH in normal subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;43:311-5.
13. Gonzalbez J, Villabona C, Ramon J, Navarro MA, Gimenez O, Ricart W, et al. Establishment of reference values for standard dose short synacthen test (250 microgram), low dose short synacthen test (1 microgram) and insulin tolerance test for assessment of the hypotha-

- lamo-pituitary-adrenal axis in normal subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;53:199-204.
14. Dickstein G. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis testing: nothing is sacred and caution in interpretation is needed. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;54:15-16.
 15. Nye E, Grice JE, Hockings GI, Strakosch CR, Crosbie GV, Walters MM, et al. Comparison of adrenocorticotropin (ACTH) stimulation tests and insulin hypoglycemia in normal humans: low dose, standard high dose, and 8-hour ACTH-(1-24) infusion tests. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3648-55.
 16. Borm K, Slawik M, Seiler L, Flohr F, Petrick M, Honegger J, et al. Is the plasma ACTH concentration a reliable parameter in the insulin tolerance test? *Eur J Endocrinol* 2003;149:535-41.
 17. Bickel U, Born J, Fehm HL, Distler M, Voigt KH. The behaviorally active peptide ACTH 4-10: measurement in plasma and pharmacokinetics in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1988;35:371-7.
 18. Oelkers W, Boelke T, Bahr V. Dose-response relationships between plasma adrenocorticotropin (ACTH), cortisol, aldosterone, and 18-hydroxycorticosterone after injection of ACTH-(1-39) or human corticotropin-releasing hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66:181-6.
 19. Weintrob N, Sprecher E, Josefsberg Z, Weininger C, Aurbach-Klipper Y, Lazard D, et al. Standard and low-dose short adrenocorticotropin test compared with insulin-induced hypoglycemia for assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in children with idiopathic multiple pituitary hormone deficiencies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:88-92.