

Estudio clínico-experimental del efecto bociógeno del tiocianato

J. García de Jalón y M. Muñoz-Rodríguez

Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra
Pamplona (España)

(Recibido el 25 de agosto de 1969)

J. GARCIA DE JALON and M. MUÑOZ-RODRIGUEZ, *Clinical-experimental Study on the Goiter Effect of Thiocyanate*. R. esp. Fisiol., 26, 53-60, 1970.

Variations in goiter occurrence and rate of thiocyanate elimination in urine were studied periodically during one year in a group of students of both sexes currently living in an area where goiter is endemic. The mean values of thiocyanate elimination during each period showed up being significantly higher in the group of students from the goiter area than the corresponding values for a control group of students, furthermore, those values for the subjects from the goiter area reached their maximum at the time of the year when the cows of the zone (whose milk the subjects drank regularly) were fed on a higher amount of turnips than at any other time of the year. High concentration of thiocyanate were also found in turnip, and when thiocyanate content was determined in the milk of cows from the goiter area and cows from a non-goiter area and the results were compared, the former showed up having a significantly higher thiocyanate concentration in their milk. The experimental study of anti-thyroid and goiter-inducing effects was also undertaken in a group of guinea pigs fed for a period of 30-90 days on turnip, and although goiter induction could not be demonstrated, a considerable inhibition of I^{131} uptake by the thyroid was apparent, this inhibition being perhaps related with the high thiocyanate concentration in blood. Paradoxically, determination of thyroid I^{127} showed much higher values for the experimental group of animals than for the control groups, which would supposedly be against the discharge effect currently attributed to thiocyanate. A supplement of iodine in the diet of the animal subjects had no effect modifying these results.

The results of the present investigation suggest the existence of a sufficient iodine ingesta in the goiter area under study and turn our attention toward thiocyanate as a probable goiter-inducing agent, although not the only one, the effect would consist of an interaction of thiocyanate with other goitrogenous substances, which would result in an interference with some of the phases of the hormone synthesis process.

It is concluded that determination of thiocyanate elimination in urine can guide us toward a better knowledge of goitrogenous substances present in the diet.

El tiocianato es un ion existente habitualmente en los fluidos humanos; su mayor concentración se ha hallado en el jugo gástrico, saliva, orina, leche y sangre. Su efecto anti-tiroideo es conocido desde hace

varias décadas, incluso en lo que respecta a su mecanismo de acción, a raíz de las observaciones de RAWSON *et al.* (16) referentes a que pacientes hipertensos tratados con tiocianatos desarrollaban algunas

veces bocio. WRIGHT (19) ha propuesto al tiocianato como factor bociógeno contenido en la alimentación humana en aquellas regiones con bocio endémico.

La idea de que el bocio endémico fuera debido a determinados alimentos era ya sospechada desde antiguo, pero no fue comprobada hasta 1928, en que CHESNEY *et al.* (8) demostraron experimentalmente la producción de bocio en ratas alimentadas con coles. Posteriormente se han implicado otras plantas, también crucíferas, entre ellas el nabo (10).

En estudios previos hemos comprobado (13, 14, 15) en una zona del norte de Navarra una alta incidencia de bocio, que aumentaba en la época de consumo de nabo por las vacas, habiéndose sugerido que fuera la leche el vehículo de los posibles factores bociógenos contenidos en el nabo.

En el presente trabajo se trata de evidenciar la importancia etiológica del tiocianato en el bocio endémico.

Material y métodos

A lo largo de un año (abril de 1967 a marzo de 1968) se ha recogido diariamente una muestra de leche de la zona de bocio en estudio (mezcla a la vez de toda la leche); todos los días se separaba 1 ml de ésta leche, que se guardaba en nevera a -20°C ; al cabo de la semana todas las muestras almacenadas eran mezcladas, para realizar conjuntamente la determinación del tiocianato según método de ALDRIDGE (1). También se determinó el contenido de yodo. Como control se determinó en la misma forma el contenido de tiocianato en la leche procedente de una granja cuyas vacas no tomaban nabo.

Paralelamente, durante la época de cultivo de nabo, se determinó su contenido en tiocianato; para ello se obtenía un jugo por cocción y prensión de las hojas y raíz del nabo, sobre el que se llevaba a cabo la determinación, según método preconizado por HAN y BOULANGÉ (9) en las cá-

maras de microdifusión de Conway y método de coloración según proceder de ALDRIDGE (1).

Clínicamente, se ha seguido, mediante exploraciones periódicas a lo largo de un año (abril de 1967 a marzo de 1968), la evolución de la incidencia de bocio en escolares de ambos sexos comprendidos entre los 6 y 14 años, elegidos indiscriminadamente de tres lugares de la zona en estudio. Asimismo se recogió de cada escolar la orina matutina por micción directa en un frasco; posteriormente las orinas se acidificaron con unas gotas de ClHN y se guardaron en nevera a 4°C hasta el momento de realizar la determinación de tiocianato y de creatinina. También se determinó el contenido de todo. El método utilizado para el tiocianato en la orina fue el mismo que el indicado para el nabo, refiriéndose al contenido de creatinina de la muestra (mg tiocianato/g creatinina); este proceder es el que preconiza VOUTH (18) para el yodo como índice de estimación fiel de la eliminación diaria a partir de una muestra casual. Así, pues, los valores que damos de eliminación de tiocianato en 24 horas son valores estimados a partir de la muestra obtenida. Como control se ha utilizado un grupo de escolares de Pamplona, cuya orina se recogió en idénticas condiciones.

Experimentalmente se estudió en cobayas el efecto antitiroideo del nabo originario de la zona en estudio. 25 cobayas (9 machos y 15 hembras) se distribuyeron en lotes, cuya dieta base era un pienso compuesto del comercio cuyo contenido de yodo era alrededor de $1\mu\text{g/g}$, además del nabo; uno de los lotes tomó un suplemento diario de unos $15\mu\text{g}$ de yodo por cobaya. La ingesta media diaria de nabo varió entre 140 y 180 g por cobaya, según el lote, y la de tiocianato se estimó entre 800 y $300\mu\text{g}$. Como control se utilizaron 9 machos y 9 hembras, cuya alimentación fue exclusivamente la dieta

Tabla I. *Ingesta media diaria por cobaya y tiempo de experiencia de los distintos lotes de animales.*

Lote	Sexo	Días Exper.	Dieta Suplemento	Pienso g	Nabo g	Iodo μ g	Tiocianato μ g
1A	♂	60	Nabos	15	140	15	805
2A	♂	90	Nabos	20	180	20	290
3A	♂	90	Nabos + Iodo	20	180	35	290
1B	♀	60	---	15	0	15	0
2B	♀	90	---	20	0	20	0

base. La distribución de los lotes, tiempo de experiencia e ingesta diaria estimada puede verse en la tabla I.

Al finalizar el período de alimentación de cada lote, se inyectó por vía intraperitoneal a cada cobaya una dosis de $8 \mu\text{C}$ de I^{131} , siendo sacrificado 24 horas después, previa anestesia con éter, abriéndoles el tórax y extrayéndoles la sangre por punción cardíaca. A continuación se disecó el tiroides y se pesó. En el tiroides y en el suero se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: captación tiroidea del I^{131} , I^{127} tiroideo, PBI^{127} , PBI^{131} y tiocianato en el suero. Para las determinaciones del I^{131} se utilizó un contador de centelleo *well type*, refiriéndose los resultados a porcentaje de la dosis administrada. Para las determinaciones del I^{127} se utilizó el método de BENOTTI y BENOTTI (4), usando patrones adecuados. El tiocianato se determinó por el método de ALDRIDGE (1).

Resultados

CONTENIDO DE TIOCIANATO EN LA LECHE. El contenido medio de tiocianato en la leche de la zona de bocio de todo el año

fue de $8,44 \pm 2,31 \mu\text{g/ml}$, y fue significativamente mayor ($P < 0,001$) que en la leche control ($3,61 \pm 1,27$).

En conjunto, el contenido de tiocianato en la leche de la zona de bocio varió muy poco a lo largo de todo el año, según puede apreciarse en la tabla II, siendo máximo en los meses de febrero y marzo; puede apreciarse asimismo un ligero descenso progresivo en los meses del final del verano y otoño, con un valor mínimo que corresponde al mes de diciembre ($5,6 \mu\text{g}$ por ml).

CONTENIDO DE TIOCIANATO EN EL NABO. El cultivo de nabo en la zona estudiada se inicia en el mes de octubre, pero su consumo no comienza a ser importante hasta finales de diciembre y dura hasta finales de mayo. Durante la época en que mantuvimos a los cobayas en experiencia se hicieron varias determinaciones de su contenido en tiocianato, cuyos resultados los damos en la tabla II. Puede apreciarse cómo es máximo en el mes de febrero, mucho mayor en la raíz que en la hoja, y en ambos disminuye en la primavera de forma sensible; este hecho está de acuerdo con observaciones referentes a otras

Tabla II. *Contenido medio mensual de tiocianato en la leche, en $\mu\text{g/ml}$.*

Zona	En.	Feb.	Mar.	Ab.	May.	Jun.	Jul.	Ag.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.
de Bocio	7,9	11,2	10,7	--	9,0	7,4	10,2	9,2	8,0	7,7	8,2	5,6
Control	4,3	5,1	--	--	4,8	2,9	3,9	3,8	3,5	3,4	2,5	2,7

Tabla III. Contenido de tiocianato en el nabo en sucesivas determinaciones ($\mu\text{g/g}$), durante el año 1968.

Mes	Día	Hoja	Raíz
Enero	28	5,1	10,4
	30	-	15,1
Febrero	20	-	24,2
	23	1,0	17,9
	25	0,7	16,4
	29	-	7,0
Marzo	2	-	9,6
	18	0,5	2,4
Abril	4	-	3,6

Tabla IV. Eliminación estimada diaria de tiocianato ($\text{mg}/24 \text{ h.}$) en los escolares de la zona de bocío.

Fecha	Nº Exp.	Tiocianato ($\text{mg}/24 \text{ h.}$)
<u>1967</u>		
Mayo	61	4,14 \pm 2,80
Junio	72	4,15 \pm 3,00
Julio	61	3,30 \pm 1,01
Octubre	16	2,80 \pm 1,80
Diciembre	50	1,94 \pm 2,10
<u>1968</u>		
Febrero	58	2,48 \pm 2,03
Marzo	41	2,33 \pm 1,96

sustancias contenidas en las partes verdes de las plantas, cuyo contenido cae en la época de floración.

ELIMINACIÓN URINARIA DE TIOCIANATO EN LOS ESCOLARES. La eliminación de tiocianato por orina varió bastante en los escolares a lo largo del año. Diciembre fue el período en que el contenido de tiocianato de la orina fue menor (tabla IV), hecho que se corresponde con el menor contenido de tiocianato observado en este mes en la leche (tabla II); es de observar,

asimismo, la caída paulatina durante la época de verano y otoño, en que no se cultiva el nabo, para aumentar posteriormente durante el invierno y la primavera (época de consumo de nabo); si bien estas épocas no se corresponden perfectamente (los valores altos se prolongan hasta julio, es decir, en época en que el nabo no se consume), su duración es superponible porque existen valores bajos al comienzo de la época de consumo (mes de diciembre). En cualquier forma, la eliminación de tiocianato en la orina de los escolares de la zona con bocío ($3,16 \pm 2,41$) (tabla IV) fue significativamente mayor ($p < 0,001$) que en el grupo control ($0,86 \pm 0,66$), valores medios correspondientes a los 60 escolares estudiados como controles.

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO DEL NABO EN LOS COBAYAS. Aun cuando la experiencia se prolongó durante tres meses, no logramos la producción de bocío en ninguno de los grupos que tomaron nabo (tabla V). El lote 2A, que fue el que más largo tiempo estuvo ingiriendo nabo, fue el que mostró mayor crecimiento tiroideo (valorado por el peso), pero no fue consistente en la comparación con su control ($P < 0,2$). Todos los lotes que ingirieron nabo aumentaron considerablemente el contenido de tiocianato en su sangre, llegando en el lote 1A hasta un valor 15 veces mayor que en los controles, con una elevada significación ($P < 0,001$). El lote 1A fue, como decimos, el que mostró valores de tiocianato en suero más elevados, lo que atribuimos a que se sacrificaron en la época en que el nabo contenía mayor cantidad de tiocianato (finales de febrero, tabla III).

Análogamente, la captación del I^{131} estuvo disminuida considerablemente en todos los lotes que fueron alimentados con nabo ($P < 0,001$), y lo mismo el PBI^{131} , que, sin embargo, sólo fue significativo en el lote 1A ($P < 0,02$), pero no en el lote 2A, a pesar de la similitud de ambos va-

Tabla V. Resultados medios obtenidos en cada uno de los grupos de cobayas.
 N = Número de animales; X ± s = media ± desviación standard.

Suplemento Dieta :	Lote 1A ♀ (60)		Lote 1B ♀ (60)		Lote 2A ♂ (90)		Lote 2B ♂ (90)		Lote 3A ♀ (90)	
	+ Nabos N	X ± s	Control N	X ± s	+ Nabos N	X ± s	Control N	X ± s	+ Nabos + Iodo N	X ± s
Peso tiroides (mg/100 g)	9	11,200 ± 3,400	9	13,400 ± 5,400	9	13,000 ± 4,700	9	10,500 ± 3,000	6	13,600 ± 3,40
Captación tiroidea (% /24 h)	9	1,630 ± 0,340	9	14,700 ± 5,000	9	1,800 ± 0,340	9	13,900 ± 5,700	1	1,640 ± -
PBI 131 (%/100 ml)	9	0,288 ± 0,104	9	3,029 ± 2,925	9	0,241 ± 0,085	9	1,179 ± 1,414	-	-
Tiocianato suero (µg/ml)	9	30,500 ± 6,800	9	1,900 ± 0,670	9	17,900 ± 5,400	9	3,750 ± 2,530	6	18,100 ± 11,00
I 127 tiroides (µg/mg)	8	1,270 ± 0,290	8	0,760 ± 0,330	9	1,160 ± 0,190	9	0,460 ± 0,140	5	1,260 ± 0,27
I 127 tiroides (µg/total)	8	58,100 ± 2,130	8	40,700 ± 12,700	9	80,100 ± 25,600	9	31,200 ± 13,000	5	93,900 ± 29,10
PBI 127, suero (µg %)	7	4,200 ± 1,300	7	3,600 ± 0,800	5	2,600 ± 0,900	4	3,200 ± 1,900	6	3,300 ± 1,20

lores, tal vez a causa del amplio desvío standard del lote 2B que le sirvió de control.

El PBI¹²⁷ sanguíneo fue similar en todos los grupos, sin significación frente a los controles.

Mención especial merece el contenido intratiroideo de I¹²⁷, que resultó mucho mayor ($P < 0,001$) en los lotes que ingirieron nabo, contrariamente a lo esperado y en contraste también con el comportamiento del tiroides frente al I¹³¹.

Finalmente, el grupo 3A, que además de nabo ingirió un suplemento de yodo (tabla I), no mostró diferencias en su comportamiento frente a los lotes alimentados sólo con nabo, siendo éste el lote que mostró un contenido de tiocianato en suero menor, pero, desde luego, elevado en relación a los controles.

Discusión

El contenido de tiocianato en el suero de los humanos de ciertas regiones con bocio endémico ha sido observado en cantidades superiores a las habituales por SILNIK y MARIKOVA (17); observación similar en el suero y los tiroides, sobre todo en aquellos con hiperplasia quística de animales vacunos, ha sido realizada por BOBEK y PELCZARSKA (5), y en la leche de vaca por BROADHEAD (6). Nuestros resultados están de acuerdo con las observaciones de estos autores. Por parecernos más fácil de realizar en los escolares, y por considerar que debiera ser tan fidedigno como en el suero, la valoración del tiocianato se ha llevado a cabo en la orina. Efectivamente, la eliminación urinaria diaria de tiocianato en los escolares de la zona de bocio endémico estudiada está significativamente elevada en relación con los controles; la pequeña variación anual observada presenta un valor mínimo en la misma época en que es mínimo el contenido de tiocianato en la leche, la cual también lo contiene en concentraciones superiores a la leche control.

A falta de realizar el análisis de las posibles correlaciones existentes entre las variaciones anuales en el contenido urinario de tiocianato, del yodo, que también ha sido estudiado y de la incidencia del bocio, que será motivo de otro trabajo, los hallazgos previos de MUÑOZ (14) en la misma zona, relativos a la importancia de la alimentación del ganado vacuno, fundamentalmente el nabo, en la bociogénesis humana y de su posible vehiculación a través de la leche, nos ha llevado asimismo a determinar el contenido de tiocianato en el nabo, hallándolo francamente elevado, sobre todo en la raíz, por la que la vaca tiene especial apetencia; nuestros resultados indican que su contenido varía poco durante la mayor parte de su época de cultivo, a excepción de la época de primavera, en que disminuyó francamente, lo que atribuimos a su posible almacenamiento en la flor y el fruto.

El alto contenido de tiocianato en el nabo queda confirmado en la experimentación animal: todos los cobayas que lo ingirieron presentaron considerable elevación de este anión en la sangre. Aunque los métodos para su determinación en el nabo y en el suero han sido distintos (el procedimiento de ALDRIDGE directo que utilizamos para el suero da valores más altos que el método de las cámaras de microdifusión de CONWAY utilizado para el nabo), los resultados obtenidos son suficientemente fidedignos al haberlos contrastado con controles y confirman las investigaciones de LANGER (11) referentes a que la ingestión de determinadas plantas crucíferas bociógenas elevan la concentración de tiocianato en el suero y la orina, tanto en el animal como en el hombre.

Se ha comprobado asimismo el efecto antitiroideo del nabo en el cobaya, basado en la inhibición de la captación del radioyodo por el tiroides; sin embargo, la existencia propiamente de bocio queda en entredicho, a pesar de haber prolongado la experiencia durante 90 días. La depresión de la captación fue tan significativa,

que impidió analizar la cromatografía de los hidrolizados tiroideos, por lo que no hemos podido estudiar los posibles trastornos existentes en la síntesis hormonal, seguramente no demasiado intensos a juzgar por la normalidad del iodo proteico I^{127} sanguíneo. Sin embargo, hay un hecho en este sentido que nos ha llamado poderosamente la atención y que en principio consideramos paradójico: nos referimos al hallazgo de un contenido de I^{127} tiroideo significativamente mayor en los lotes alimentados con nabo que en sus controles. La ingesta de iodo no parece guardar relación con este hecho, que está en oposición con los hallazgos de LANGER (12) y de BROADHEAD (6); estos autores han determinado el contenido de iodo estable tiroideo en ratas sometidas en experimentación prolongada (1-3 meses) a la acción de ciertas drogas antitiroideas (tiocianato, propiltiouracilo, etc.), y lo encuentran constantemente disminuido, bien es verdad que en los trabajos a que nos referimos, sus autores administran los bociógenos de una manera aislada y no asociados en un alimento como vehículo de los mismos, como parece ser el caso del nabo.

En el nabo y otras plantas crucíferas, así como en la leche, se han aislado diversas sustancias bociógenas, con mecanismos de acción diferentes, y que en relación a su estructura química son: a) el tiocianato como tal, al que ya nos hemos referido repetidamente; b) varios isotiocianatos de los que el alilisotiocianato (3, 12) es el más representativo; c) diversas tiooxazolidinas, de las que la goitrina (2) es la mejor conocida. Tanto los isotiocianatos como las oxazolidinas se encuentran al estado natural en forma tioglicósidos —sin actividad bociógena— que liberan las sustancias activas en virtud de la hidrólisis producida por una enzima (mirosinasa) contenida también en las plantas, y al parecer también por la acción bacteriana del tubo digestivo. El tiocianato inhibe la captación tiroidea del yoduro, pero no su di-

fusión pasiva, mientras que la goitrina, el alilisotiocianato y, en general, las sustancias activas de los tioglicósidos naturales se comportan de manera similar a los derivados tioureicos, es decir, interfiriendo la oxidación del iodo y ulterior unión orgánica. Nosotros hemos podido comprobar en el nabo (raíz y hojas) un elevado contenido de tiocianato y también de goitrina (semillas) (15).

En la explicación de esta acumulación tiroidea del iodo observada en los cobayas alimentados con nabo cabe pensar: a) la acción del tiocianato sobre el bloqueo de la captación del iodo comprobada con el I^{131} puede permitir su difusión pasiva; b) en el tiroides la acción de la goitrina, potenciada o interferida por otros posibles bociógenos, impediría la biosíntesis hormonal y el iodo inorgánico quedaría de este modo acumulado; en fases posteriores el estímulo reiterado de TSH, liberada en exceso por disminución de la hormona tiroidea circulante, llevaría a la producción de bocio. De esta forma podría explicarse cómo en zonas de bocio endémico, donde la ingesta de iodo es normal o incluso elevada, la eliminación urinaria es muy pobre, resultando siempre un balance fuertemente positivo. Tal es, al menos, el caso de la zona que nos ocupa (13). Cabría pensar que en tales condiciones el iodo acumulado en el tiroides llegaría a ser excesivo, pero es muy posible que tales circunstancias sólo concurren en los primeros años de la vida y posteriormente, en la edad adulta, el cambio frecuente de residencia, temporal o permanente, u otras causas, permitan una normalización tiroidea, eliminados los factores bociógenos ambientales, sobre todo alimenticios.

Resumen

En un grupo de escolares de ambos sexos, procedentes de una zona de bocio endémico, se ha estudiado a lo largo de un año las variaciones en la incidencia de bocio y de la eliminación urinaria de tiocianato, mediante deter-

minaciones periódicas de estos parámetros. Los valores medios de tiocianato eliminado en cada período son significativamente mayores que los encontrados en un grupo de escolares control, siendo máximo en la época de mayor consumo de nabo por las vacas. En el nabo también se han encontrado valores elevados de tiocianato, y la leche de las vacas de la región en estudio también lo contenía en concentraciones significativamente mayores que una leche control. Paralelamente, se ha llevado a cabo el estudio experimental del efecto antitiroideo y bociógeno del nabo en un lote de cobayas sometidos a alimentación prolongada (30-90 días); no se ha demostrado la producción de bocio, pero existía una considerable inhibición de la captación del I^{131} por el tiroides, relacionable con el alto contenido de tiocianato en la sangre de estos animales. La determinación de I^{127} tiroideo ofrecía, paradójicamente, valores significativamente mucho mayores que los grupos de cobayas controles, efecto opuesto al de descarga que se atribuye al tiocianato. El suplemento de iodo en la alimentación no originó diferencias significativas en estos hallazgos. Estos resultados sugieren que en áreas de bocio endémico en que existe una ingesta de iodo suficiente, el tiocianato debe ser un factor bociógeno a tener en cuenta, pero probablemente no el único de forma que de su interacción resulte la acumulación del iodo en el tiroides al ser interferida la hormonosíntesis en alguna de sus fases. Se concluye que la determinación del tiocianato en la orina de los individuos de una zona de bocio endémico puede ser una guía fiel de la existencia de sustancias bociógenas en la alimentación.

Bibliografía

1. ALDRIDGE, W. N.: *Analyst*, **69**, 262, 1944.
2. ASTWOOD, E. B.: *J. Biol. Chem.*, **181**, 121, 1949.
3. BAILEY, H.: *J. Food. Sci.*, **26**, 163, 1963.
4. BENOTTI, J. y BENOTTI, N.: *Clin. Chem.*, **9**, 408, 1963.
5. BOBEK, S. y PELCZARSKA, A.: *Nature*, **1**, 98, 1002, 1963.
6. BROADHEAD, G. D., PEARSON, I. B. y WILSON, G. M.: *Brit. Med. J.*, **1**, 343, 1965.
7. BROADHEAD, G. D., PEARSON, I. B. y WILSON, G. M.: *J. Endocrin.*, **32**, 341, 1965.
8. CHESNEY, A. M., CLAWSON, T. A. y WEBSTER, B.: *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **43**, 261, 1928.
9. HAN, K. y BOULANGÉ, M.: *Clin. Chim. Acta*, **8**, 779, 1963.
10. KENNEDY, T. H. y PURVES, H. D.: *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **22**, 241, 1941.
11. LANGER, P.: *Nature*, **185**, 174, 1960.
12. LANGER, P. y STOLC, V.: *Endocrinology*, **76**, 151, 1965.
13. MUÑOZ, M.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **7**, 49, 1964.
14. MUÑOZ, M.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **8**, 149, 1964.
15. MUÑOZ, M.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **10**, 27, 1964.
16. RAWSON, H. L., HERTZ, S. y MEANS, J. H.: *Ann. Inter. Med.*, **19**, 829, 1943.
17. SILINIK, K. y MARSIKOVA, L.: *Nature*, **167**, 528, 1951.
18. VOUGHT, R. L. y LONDON, W. T.: *J. Clin. End.*, **25**, 157, 1965.
19. WRIGTH, E.: *Nature*, **181**, 1602, 1958.