

59. KLEINERMAN, J.—Laborat. Invest., 3, 495, 1954.
 60. KRAKOWER, C. A., y GREENSPAN, J. A.—Arch. Pathol., 51, 629, 1951; 58, 401, 1954.
 61. BAXTER, J. H., y GOODMAN, H. C.—J. Exp. Med., 104, 467, 1956.
 62. SELYE, H., y HALL, C. E.—Arch. Path., 36, 19, 1943.
 63. MASON, G. M.; CORCORAN, A. C., y PAGE, I. H.—Arch. Pathol., 53, 217, 1952.
 64. RICH, A. R.; BERTHRONG, M., y BENNETT, I. L.—Bull. J. Hop. Hosp., 87, 549, 1950.
 65. BLOODWORTH, J. M. B., y HAMWI.—Diabetes, 5, 37, 1956.
 66. WILSON, y BYROM.—Quart. J. Med., 10, 65, 1941.
 67. BARREDA, P.; JIMÉNEZ DÍAZ, C., y MORALES, M.—Rev. Clin. Esp., 19, 310, 1945.
 68. FISCHER, E. E.—J. Chron. Dis., 5, 34, 1957.
 69. CAVELLI, P. A., y CALVETI, E. S.—Arch. Pathol., 39, 148, 1945; 40, 158, 163, 1945.
 70. HUMPHREY, J. H.—J. Pathol. y Bact., 60, 211, 1948.
71. PECK, J. L., y THOMAS, L.—Proc. Soc. Exp. Biol. y Med., 69, 451, 1949.
 72. MIDDLETON, E.; MIDDLETON, E. B., y SEEGAL, B. C.—Arch. Path., 56, 125, 1953.
 73. JIMÉNEZ DÍAZ, C.—Horizontes en la patogénesis. Madrid, 1955.
 74. PFEIFFER, E. F., y BRUCH, U. H. E.—Erg. Inn. Med. (N. F.), 4, 670, 1953.
 75. VORLAENDER, K. O.—Zeit. f. d. ges. Exp. Med., 118, 352, 1951.
 76. KRECKE, H. J.—Münch. Med. Wschr., 97, 355, 1955.
 77. LANGE, K.; GOLD, M. A.; WEINER, D., y SIMON, V.—J. Clin. Invest., 28, 50, 1949.
 78. LANGE, K., y WENK, E. J.—Am. J. Med. Sci., 228, 448, 1954.
 79. KNOWLTON, A. I.; STOERCK, H. C.; SEEGAL, B. C., y LOEB, E. W.—Endocrinology, 38, 315, 1946.
 80. HEYMAN, W., y HACKEL, D. B.—Am. J. Path., 27, 712, 1951.
 81. SEEGAL, B. C.; HASSET, M. W.; GAYNOR, E. C., y ROTHEMBERG.—J. Exp. Med., 102, 789, 1955.

ORIGINALS

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA ELIMINACION URINARIA DE ALDOSTERONA UTILIZANDO PARA SU DETERMINACION UN METODO FISICO-QUIMICO CUANTITATIVO

L. HERNANDO (*), L. SÁNCHEZ SICILIA
y J. BOTELLA GARCÍA.

Con la colaboración de

MARÍA TERESA TORRES.

Del I. I. C. y M. Clínica de Nuestra Señora de la Concepción.

El factor retenedor de sodio de la llamada fracción amorfa de los extractos purificados de corteza suprarrenal, puesto de manifiesto por primera vez en estudios realizados a principios de la tercera década de este siglo, no pudo, sin embargo, ser aislado hasta el año 1952, y otros dos años habían de transcurrir antes de conseguirse la cristalización del material puro y conocerse la estructura química completa de la nueva hormona, que fué bautizada con el nombre de aldosterona para recordar lo más característico de su fórmula¹.

Hacia 1950 los estudios de DEMING y LUETSCHER², en San Francisco, sobre la eliminación por la orina de una sustancia capaz de retener el sodio, especialmente aumentada en las enfermedades que cursaban con edemas, abrían una nueva e interesantísima vía de estudio sobre el problema del mecanismo de la retención del sodio en estado fisiológico y en las distintas situaciones patológicas. Esta vía había de confluir y confundirse con la anterior al demostrarse en 1954¹⁷ que esta sustancia era la propia aldosterona.

Hasta la fecha, sólo algunos miligramos del nuevo esteroide han podido ser utilizados por los distintos investigadores; sin embargo, los progresos logrados en el conocimiento de sus actividades biológicas y su posible papel fisiológico han sido considerables, aprovechando en parte la experiencia adquirida con los estudios realizados sobre los distintos esteroides corticales aislados con anterioridad.

La determinación y medición de esta hormona en los líquidos biológicos tiene un interés extraordinario. La cantidad en que está presente en sangre (0,08 microgramos por 100 c. c.) es tan exigua, que no existe ningún método aplicable a la investigación clínica utilizable para medir niveles tan bajos en un número suficiente de casos que autorice a sacar conclusiones válidas. Por tanto, ha sido en orina y en muestras de veinticuatro horas sobre las que han trabajado la mayor parte de los investigadores interesados en estos problemas.

En las páginas siguientes describimos el método con el que hemos venido trabajando estos últimos doce meses y los resultados obtenidos hasta la fecha, que en líneas generales concuerdan con los obtenidos por otros investigadores que utilizan estos métodos químicos o biológicos.

Todos los métodos publicados hasta ahora consisten en la extracción de una mezcla de la orina recogida durante 24 ó 48 horas, después de hidrólisis ácida o enzimática, con solventes orgánicos del tipo capaz de extraer sólo los esteroides libres; purificación del extracto de distintas maneras para, en alguno de los métodos que utilizan el procedimiento biológico como cuantitación, efectuar éste en aquel extracto todavía relativamente "crudo", mientras que en otros el ensayo animal no es realizado hasta después de una purificación más detenida, que suele comprender una o más cromatografías en

(*) Becario de la Fundación Juan March. Año 1957.

papel en distintos sistemas. Esta fase de separación cromatográfica es obligada en los métodos químicos.

Nuestro método es muy semejante al propuesto por NEHER y WETTSTEIN*, del que sólo difiere en algunas modificaciones.

REACTIVOS. INSTRUMENTOS.

Ácido clorhídrico concentrado.

Cloroformo destilado antes de usarse sobre carbonato potásico.

Si no se dispone de un cloroformo lo suficientemente puro (*) es conveniente lavarlo previamente con ácido sulfúrico, después con agua hasta neutralidad, secar con sulfato sódico, destilar y estabilizar.

Hidróxido sódico, 0,1 N.

Florisil (Floridin Co. Tallahassee. Florida). Antes de usarlo se lava en agua destilada; después en etanol, 95 por 100; se seca; se activa, calentándolo en mufla a 600° C. durante cuatro horas. Conservar en desecador hasta el momento de usarlo. Activar cada siete días.

Papel Whatman para cromatografía número 1.

Tolueno.

Propilen glicol.

Metanol destilado sobre dinitrofenilhidracina.

Acetato de etilo. Lavar tres veces con agua. Después, solución 50 por 100 de cloruro cálcico. Destilar sobre carbonato potásico o cloruro cálcico.

Ácido acético glacial.

Etanol, 95 por 100.

Hidróxido de tetrametilamonio (Fluka), solución acuosa al 10 por 100. Antes de usarse se diluye en la proporción de 1/10 en etanol, 95 por 100.

Azul de tetrazolio (Dajac). En solución saturada, 500 mg./100 c. c. etanol. Se conserva varios meses en frasco topacio en la nevera. Filtrar antes de usarse.

Papel fotográfico de contacto (Kodak, Gevaert, Teleco, Valca).

Fuente de luz ultravioleta: Mineralight, modelo SL 2.537. (Ultraviolet Products Inc. San Gabriel, California.)

Las lecturas de la reacción química final y de las reacciones de identificación han sido realizadas en un espectrofotómetro de Beckmann modelo DU.

Las determinaciones de sodio y potasio en el fotómetro de llama, adaptado al instrumento anteriormente señalado.

Las determinaciones de cloro, por el método de Carius, modificado por Sendroy y Van Slyke.

Volumen sanguíneo y plasmático: Azul de Evans. Hemocrito, tubo de Wintrobe.

TÉCNICA DE LA DETERMINACIÓN.

Recogida.—Las orinas de 24 horas, o en determinadas ocasiones fracciones de las mismas, son recogidas en nevera (—4° C.) y conservadas en cámara frigorífica (—18° C.) si se ha de demorar un cierto tiempo su extracción; conviene añadir una pequeña cantidad de tolueno como preservativo.

Hidrólisis.—El volumen total de la orina de 24 horas, ó 1.000 c. c. de la misma si la diuresis es mayor de un litro, son colocados en un embudo separador con cabida para dos litros y puestos a pH 1 por la adición de ácido clorhídrico concentrado. El grado de acidez se comprueba con indicador de papel.

Extracción.—En el mismo momento de empezar la hidrólisis se le añade la primera porción de cloroformo, mitad del volumen total de orina, agitando energicamente durante unos minutos para después dejar reposar y separar las dos capas durante 48 horas; pasado este tiempo se considera la hidrólisis concluida y se acaba la extracción separando el primer cloroformo y añadiendo

(*) En nuestras manos, el cloroformo Abelló ha dado buenos resultados.

un tercio del volumen total dos veces más. Cuando se forma emulsión, ésta se rompe por centrifugación durante diez minutos.

Purificación.—El cloroformo utilizado en estas sucesivas extracciones se reúne y lava con una solución 0,1 N de hidróxido sódico una vez y luego tres con agua destilada. El lavado con soda puede repetirse en caso de existir gran cantidad de pigmentos en la orina. Estos lavados se realizan con una cantidad equivalente al 5 por 100 del volumen total de cloroformo.

El cloroformo ya lavado se seca sobre sulfato sódico anhídrido para evaporarlo, bajo presión reducida, en un baño de temperatura constante regulado a 40° C., recuperándose parte (60 por 100) del cloroformo utilizado.

El extracto seco se recoge en varias veces en unos 10 c. c. de cloroformo y se añade a una columna provista de una placa filtrante, tipo 2 de Rosich, que contiene Florisil hasta una altura de 5 cm. desde la placa por 1 cm. de ancho, y que ha sido previamente lavada con 25 c. c. de cloroformo. Una vez absorbido el extracto, y sin permitir que se seque la columna, se lava con otros 25 c. c. de 1/99 metanol/cloroformo y, finalmente, se eluye con 45 c. c. de 25/75 metanol/cloroformo. Este elujo se seca en un "flub" (Erlenmeyer de 50 c. c., en cuyo fondo existe un pequeño depósito central de 1 c. c. de cabida) a 40° C. y bajo corriente de nitrógeno.

Cromatografía.—El elujo seco procedente de la columna se diluye en una cantidad mínima de metanol/cloroformo y se pasa a una tira de papel Watman, cortado por razones de conveniencia a 19 cm. de ancho, y se pone en una línea de unos 10 cm. de longitud y del menor grosor posible; a ambos lados de esta línea de partida se ponen patrones de cortisona e hidrocortisona (*), impregnándose después el papel en una mezcla de propilen glicol/metanol 40/60 por encima y por debajo de la mencionada línea. El líquido sobrante se seca entre dos hojas de papel y la tira se cuelga y aísla durante cinco minutos antes de ser introducida en el tanque de cromatografía convenientemente saturado, añadiendo a la cubeta en la que queda introducida la parte superior del papel 200 c. c. de tolueno saturado con Propilen glicol; a las 24 horas es necesario recoger la cubeta y a las 48 horas la separación es suficiente y se saca el papel del tanque dejándole secar hasta el día siguiente. Después de seco se obtiene una fotografía con luz ultravioleta del cromatograma para comprobar si la separación es suficiente y localizar las distintas bandas (fig. 1).

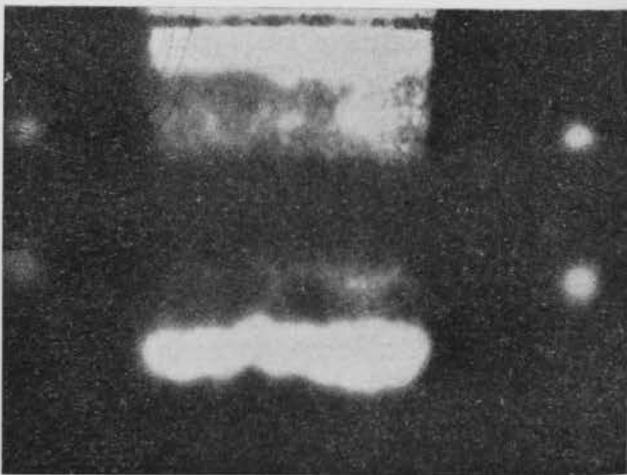


Fig. 1.

La banda que este primer sistema emigra con la cortisona se marca, corta y eluye con metanol (10 c. c. doce horas y luego dos lavados con 5 c. c. cada vez).

El producto de esta elución se seca nuevamente a

(*) Los patrones de cortisona e hidrocortisona alcohol libre nos han sido amablemente facilitados por la casa Schering (Berlín) a través del doctor don LUIS SÁNCHEZ.

40° C. bajo corriente de nitrógeno y el residuo seco se vuelve a tomar en una cantidad mínima de cloroformo para llevarlo a un segundo papel, que también lleva a ambos lados patrones de cortisona e hidrocortisona. La parte central de este papel, más estrecho que el anterior (15 cm.), está dividida en dos porciones iguales: en una, se coloca el problema, y la otra, queda vacía para ser utilizada como blanco de papel. El papel utilizado en esta segunda cromatografía se extrae antes de ser utilizado, durante cuatro horas, en un aparato de Soxhlet con metanol 60 por 100.

El papel con el problema y los patrones se coloca dentro de un segundo tanque de cromatografía, dispuesto según el sistema C de Bush (metanol/agua/tolueno/acetato de etilo, 500/500/900/100), y después de quince horas de equilibrio se añade la fase móvil en la cubeta superior y se deja correr durante dos horas. El papel, seco a los pocos minutos de estar fuera del tanque, se fotografía nuevamente con luz ultravioleta (fig. 2). La banda

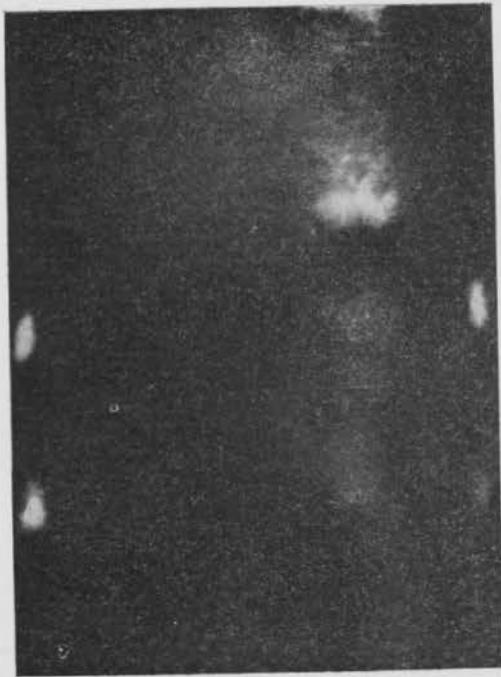


Fig. 2.

que ahora se marca y corta es la que corresponde al patrón de la hidrocortisona; se eluye en metanol en la misma forma que señalábamos anteriormente, siendo estas mismas operaciones realizadas sobre una parte proporcional del blanco de papel de la zona que se dejó libre.

Finalmente se lleva a cabo sobre los eluyatos secos de estas dos fracciones la reacción de NOWACZINSKI, GOLDEN y GENEST⁴. Para ello se añade a cada tubo 1,5 c. c. de etanol, después 0,25 de la solución de azul de tetrazolio y más tarde 0,25 c. c. de hidróxido de tetrametilamonio; después de agitar para lograr una mezcla perfecta se deja desarrollar color en la oscuridad durante veinticinco minutos. Transcurrido este tiempo se añade 1 c. c. de ácido acético glacial a cada tubo, y después de bien mezclado se traslada a las cubetas del espectrofotómetro de Beckman, donde se leen a una longitud de onda de 510 m. μ . Además de los correspondientes blancos de papel se corren un blanco de reactivos y dos series de patrones de cortisona de 5 a 20 ó de 2,5 a 10 microgramos, según los casos.

La cantidad de aldosterona en 24 horas se calcula a partir de la densidad óptica del problema menos su blanco de papel y sobre la base de la densidad óptica media de un microgramo de cortisona (cuya densidad óptica para esta reacción es sólo de un 5 por 100 menor que la de la aldosterona). En caso de no haber sido extraída

la cantidad total de orina eliminada en las 24 horas, el resultado final se calcula teniendo en cuenta la parte alícuota extraída.

IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO AISLADO POR ESTA TÉCNICA.

Para asegurarnos de la identidad del esteroide obtenido por este método hemos realizado sobre el residuo seco procedente de la elución del papel en el segundo sistema cromatográfico las siguientes reacciones químicas:

Curva de absorción ultravioleta del producto disuelto en etanol, que demuestra un máximo a 240 m. μ de acuerdo con el obtenido para la aldosterona por SIMPSON y TAIT⁵.

El espectro en ácido sulfúrico concentrado con máximo a 288 m. μ idéntico al obtenido por SIMPSON, TAIT, NEHER, von EUW, SCHINDLER y REICHSTEIN para la aldosterona cristalizada⁶.

La reacción de la difenilamina demostró máximos a 640 y 530 m. μ con un mínimo a 450 m. μ y un perfil superponible al publicado por CLARK⁷ para la aldosterona pura.

Reducción inmediata del azul de tetrazolio en el papel y en el tubo.

Negatividad de la reacción Porter Silver, que puso de manifiesto la ausencia de un grupo —OH en posición 17.

Fluorescencia amarilla intensa al exponer a una fuente de luz ultravioleta el compuesto tratado con una solución de hidróxido sódico en metanol⁸.

Investigación cromatográfica. — Una mezcla de partes alícuotas del residuo seco procedente de la banda que corre con la hidrocortisona en el Bush ha sido recromatografiada en el sistema de ZAFFARONNI⁹ y nuevamente en el de BUSH⁸ paralelamente a patrones de cortisona, hidrocortisona y aldosterona. En los dos sistemas los Rf absolutos y relativos fueron idénticos a los de la aldosterona y siempre corrió como una sola mancha.

Todas estas pruebas han sido efectuadas paralelamente con idénticos resultados sobre cantidades proporcionales de aldosterona pura obtenida por generosidad de la casa Ciba, de Basilea, a través de los doctores NEHER y WERTSTEIN.

REPRODUCIBILIDAD.

No hemos intentado repetir los estudios de recuperación, aceptando nuestra experiencia anterior a este respecto; si hemos repetido, sin embargo, los estudios de reproducibilidad trabajando en dos ocasiones con partes alícuotas de una mezcla de orinas de pacientes que se sabía eliminaban cantidad elevada de aldosterona; las extracciones se efectuaron en una ocasión el mismo día y en la otra en día distinto; la cantidad de orina extraída fué la misma, pero mientras que en una ocasión se trabajó con un volumen pequeño, en la segunda las cantidades

fueron más grandes. En el primer caso los valores obtenidos para las cuatro partes alícuotas fueron: 38, 40, 42 y 55; en la segunda: 82, 92, 95 y 100.

RESULTADOS.

Sujetos normales. — En un total de veinte muestras diferentes procedentes de hombres y mujeres sin enfermedad aparente que pudiera afectar la secreción de aldosterona, los valores obtenidos han oscilado entre 2 y 15 microgramos en las 24 horas con una media de 6. Los valores altos por encima de 10 microgramos en las 24 horas pudieron ponerse en relación en algunas ocasiones con recogida en días excepcionalmente cálidos o con una ingestión habitual restringida en sodio, pero otras no existía causa aparente para esta elevación. En quince de los sujetos no se hizo ningún intento de regular el sodio ingerido en la dieta, estando los otros cinco sometidos a un régimen que contenía 8 gr. de cloruro sódico además del gramo de sodio que llevaba la dieta.

Pacientes con distintas enfermedades que afectan primitivamente a las cápsulas suprarrenales:

1. Síndrome adrenogenital (un caso). Posible adenocarcinoma. Cifras elevadas de 17-cetos (35 mg./24 h.) en condiciones basales sin respuesta a la estimulación con ACTH ni a la supresión con fluorohidrocortisona. Aldosterona: 8, 4 y 5 microgramos por día.

2. Enfermedad de Addison (un caso). Cifras de 17-hidroxis por debajo de los 2 mg./24 horas. Sin respuesta a la administración de ACTH. Aldosterona: 2,0 microgramos por día.

3. Síndrome de Cushing (dos casos). Probablemente por hiperplasia. Cifras basales de 17-hidroxis muy elevadas (respectivamente, 20 y 31 mg./24 h.) y respuesta marcada al estímulo con ACTH. Aldosterona: respectivamente, 5,2 y 5,8 microgramos por día.

4. Feocromocitoma (un caso). Prueba regitina, positiva. Comprobación anatómica. Aldosterona: 13 y 12 microgramos por día.

5. Síndrome de Conn. Este caso merece mención aparte. Se trata de una mujer todavía en estudio: Hipertensión desde hace tres años; en una exploración practicada en el Departamento de Cardiología de la Clínica de Nuestra Señora de la Concepción se le encontró un trazado electrocardiográfico compatible con hipokaliemia; confirmada la cifra baja de potasio en sangre, nos fué remitida para completar su estudio con el diagnóstico de probable síndrome de Conn: hiperaldosteronismo primario. Las restantes investigaciones hasta ahora realizadas parecen confirmar la sospecha inicial y la enferma se encuentra actualmente preparándose para ser intervenida. Los datos más salientes hasta ahora obtenidos se resumen en la figura 3.

Pacientes con enfermedades que cursan con edemas. Grupo de los llamados aldosteronismos secundarios:

CUADRO I
ALDOSTERONISMOS SECUNDARIOS

		Aldosterona $\mu\text{g}/24 \text{ horas}$
Nefrosis (dos casos):		
1. En periodo de retención	Dieta, 400 mg. Na/dia.	59 y 25.
Fase de diuresis	Dieta libre.	2, 5 y 0.
2. En periodo de retención	Dieta libre.	15 y 25.
Cardiacos (tres casos):		
1. Enfermedad mitral descompensada	Dieta, 1 gr. Na/día.	29 y 24.
2. Enfermedad mitral descompensada	Dieta, 200 mg. Na/día.	18 y 22.
Después de digitalizado, desaparición de edemas	Dieta libre.	13 y 9.
3. Aórtico, predominio estenosis	Dieta libre.	8 y 11.
Hipertensión esencial (dos casos):		
1. Mujer, 45 años, 24/13	Dieta libre.	8 y 4.
2. Mujer, 14 años, 22/11	Dieta, 1 gr. Na más 4 gr. ClNa.	9 y 6.
Cirrosis hepática (cuatro casos):		
1. Cirrosis posthepatitis	Dieta, 1 gr. Na/día.	40 μg . *
2. Cirrosis alcohólica	Dieta, 1 gr. Na/día.	60 μg . **
3. Cirrosis alcohólica	Dieta libre.	48 μg . **
4. Cirrosis posthepatitis	Dieta libre.	35 μg .

* = media de 60 determinaciones.

** = media de 5 determinaciones.

Un total de 134 determinaciones han sido realizadas en la orina de cinco de estos pacientes durante períodos de observación y tratamiento que llegan a uno y tres meses; los datos recogidos forman parte de un trabajo sobre la patogenia de los edemas en la cirrosis hepática que aparecerá más adelante.

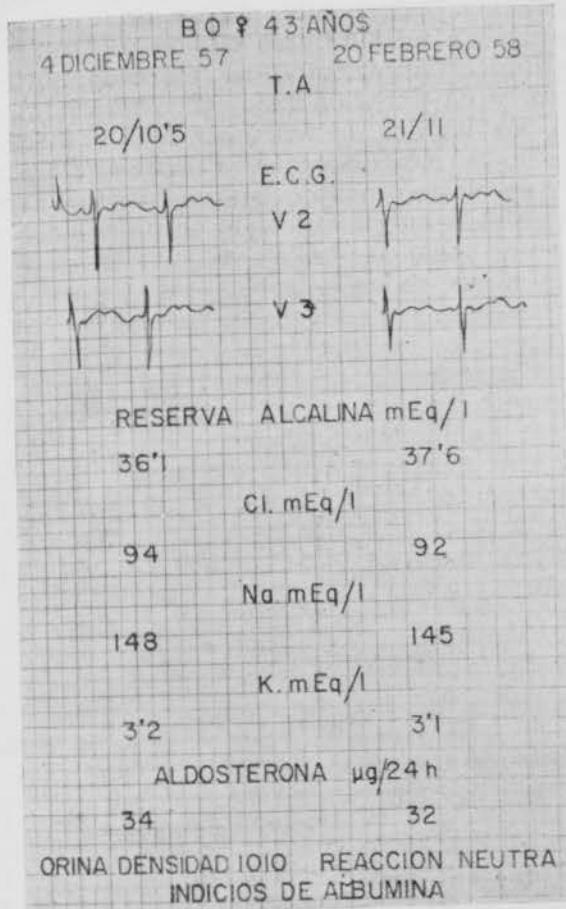


Fig. 3.

En líneas generales encontramos la eliminación de aldosterona muy aumentada en las cirrosis hepáticas con descompensación hidrópica de distinta etiología para volver a la normalidad al desaparecer los edemas y la ascitis (5 μ g. (media de 5 determinaciones, 4).

Alteraciones en la eliminación de la aldosterona urinaria provocadas por las variaciones en la cantidad de sodio ingerido en la dieta y los cambios en el volumen de los líquidos extracelulares.

La restricción de sodio en la dieta produjo en todos los sujetos normales por nosotros estudiados un aumento de la aldosterona urinaria, aunque en general éste no se hizo patente hasta el tercero o cuarto días de régimen pobre en sal, cuando el sujeto se hallaba en un balance negativo de sodio y había perdido peso de manera evidente. En la figura 4 se representan los resultados de la supresión del sodio de la dieta de un individuo normal, la relación existen-

te entre la eliminación de sodio y de aldosterona en la orina de cuatro sujetos sometidos a un régimen de 9 mEq. de sodio al día, durante los cuatro primeros días de la prueba, y, finalmente, una variación del primer experimento, que consistió en añadir el día antes de la supresión de sodio un inhibidor de la secreción de la hipófisis posterior, en este caso alcohol, para ver si una deplección principalmente acuosa tenía un efecto parecido al que se logra con la administración de un diurético en este mismo día; en este caso el resultado fué positivo y el aumento en la eliminación de aldosterona fué, a la vez, más precoz y más intenso.

Sudoración.—En un caso de un individuo con respuesta suprarrenal normal que eliminaba en tres días basales 3, 10 y 11 microgramos de aldosterona por día con un media de 8. Una sudoración intensa capaz de hacer perder 800 gr. en una ocasión y 1 kilo en la otra, llevada a cabo jugando un partido de tennis en un día caluroso de junio, aumentó los valores basales a 14 y 19 microgramos en 24 horas en dos días consecutivos. En este experimento no se hizo ningún intento de someter al sujeto a dieta fija ni restringir la ingestión de agua.

Administración de diuréticos.—En un paciente con cirrosis posthepatitis sometido durante varios meses a una dieta pobre en sodio, la administración de un diurético mercurial acompañada de la correspondiente diuresis de cloro y

EFFECTO DE LA RESTRICCION DEL SODIO EN LA DIETA SOBRE LA ELIMINACION DE ALDOSTERONA URINARIA

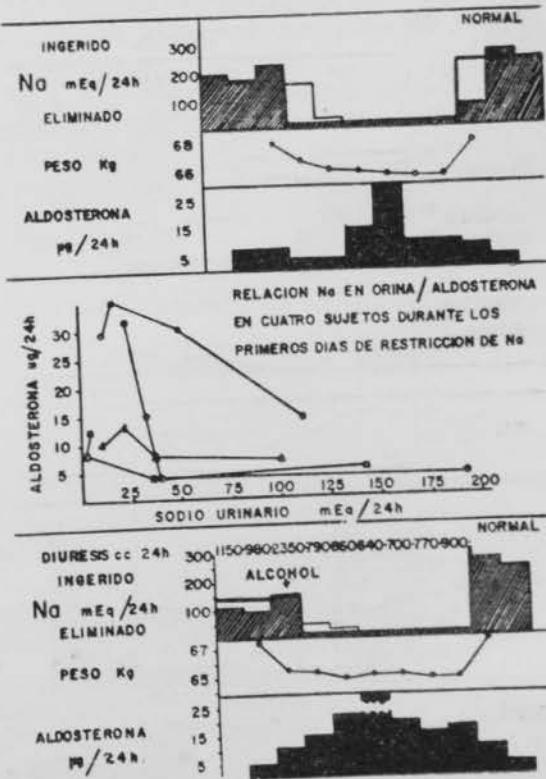


Fig. 4.

sodio hizo elevarse la eliminación de aldosterona, ya inicialmente elevada, a valores extraordinarios. Al ir agotándose la respuesta al mercurial y disminuyendo la diuresis de sodio de manera paralela, bajó la eliminación de aldosterona, mostrando una relación estrecha y directa entre las cantidades de sodio y de hormona eliminadas (fig. 5).

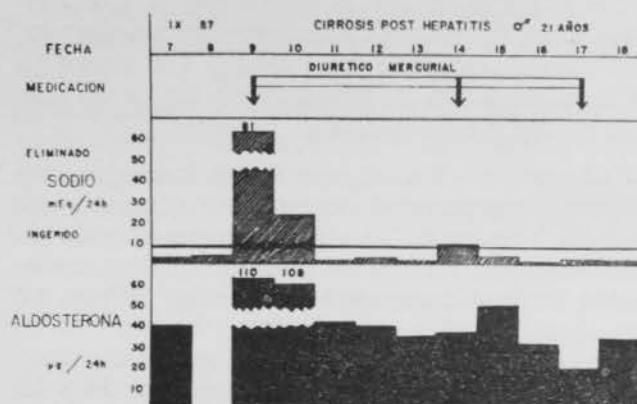


Fig. 5.

Experiencias sobre la acción de la hipófisis anterior en la secreción de aldosterona y resultados obtenidos con la administración de ACTH.

En un caso de hipopituitarismo clínicamente evidente y confirmado por los datos de labora-

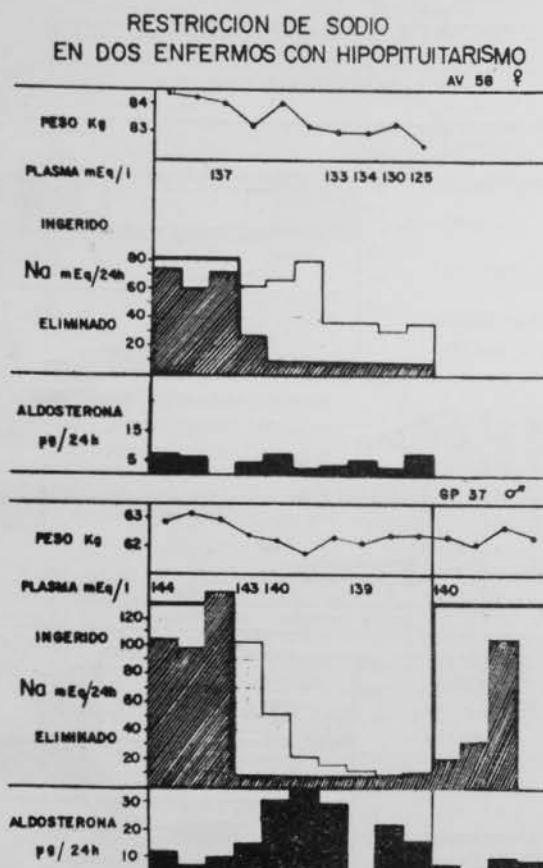


Fig. 6.

torio, investigamos la respuesta a la restricción de sodio colocándole en balance para saber la cantidad de sodio ingerida y la cantidad de sodio, cloro y potasio eliminada en la orina de 24 horas, el enfermo fué pesado en idénticas condiciones todos los días; parte de los datos así obtenidos se representan en la figura 6, comparativamente con un caso estudiado por uno de nosotros anteriormente. Estos dos pacientes presentaban un síndrome clínico y bioquímico de panhipopituitarismo, más marcado, sin embargo, y de duración más larga en el primer caso. En los dos, la respuesta a la restricción de sodio fué muy diferente, pues mientras la primera se mostró incapaz de aumentar su secreción de aldosterona entrando en un balance negativo de sodio que la llevó a una situación que obligó a suspender la prueba, en el segundo la respuesta fué la de un sujeto normal, y después de pocos días de balance negativo, durante los cuales la secreción de aldosterona ascendió rápidamente, recuperó el equilibrio perdido entre ingesta y eliminación.

En este mismo sujeto la respuesta a la administración de ACTH cursó con un evidente ascenso de la eliminación de aldosterona, proporcionalmente mayor que el aumento paralelo de 17-cetoesteroides y 17-hidroxis (fig. 7).

DIA	DIETA	R _X	ORINA	C1	Na	K	17-O	17-OH	ALDO
1		o	1030	140	150	34	5'4	0'3	—
2		o	750	93	105	24	6	0'6	12'5
3	1 g Na + 8g Cl Na	25 U ACTH IV 8h	1450	174	166	42	7'5	2'6	23
4		25 U ACTH IV 8h	1170	716	63	40	7	6'2	20
5		o	540	466	59	148	6	4'6	2
6		o	650	108	102	166	5	3'9	9'5

Fig. 7.

En otras dos ocasiones se hicieron determinaciones de aldosterona en la orina en días de estimulación con ACTH. En un sujeto normal, con una respuesta normal desde el punto de vista de los 17 = O y los 17 - OH, la aldosterona también aumentó, aunque en proporción más pequeña; fué notable la disminución en los días siguientes a la prueba. Días basales, 5 y 7; días ACTH (25 U. intravenosas/8 horas en 500 c. c. de suero glucosado), 12 y 9; después de ACTH, 1 y 3.

La otra prueba fué practicada en una enferma que padecía un síndrome adrenogenital por posible adenocarcinoma suprarrenal; en los días de estimulación las cifras fueron de 10 y 13, respectivamente; en los días siguientes, 8, 3,5 y 5. La respuesta de los 17 - OH estaba dentro del límite normal y los 17 = O, inicialmente altos, se afectaron poco en los días de la prueba.

COMENTARIOS AL MÉTODO.

La falta de una reacción de especificidad y sensibilidad suficiente para poder medir la aldosterona en la exigua cantidad que se encuentra presente en los fluidos biológicos obliga a su individualización cromatográfica antes de proceder a su estimación cuantitativa por una reacción sensible, aunque inespecífica.

El método descrito en las páginas anteriores permite la determinación de aldosterona urinaria; ahora bien, la cantidad de tiempo necesaria para llevar a cabo cada determinación o grupo de determinaciones no inferior a ocho días, su delicadeza y elevado coste, le convierten en un método únicamente de investigación y sin aplicación en la clínica práctica. El método, tal y como es, nos permite seguir las variaciones en la eliminación urinaria de aldosterona durante estudios metabólicos y pruebas terapéuticas; de aquí su importancia y utilidad en la investigación de los factores, todavía en gran parte desconocidos, que gobiernan la secreción de aldosterona.

Nuestro método sigue con modificaciones de detalle al propuesto por NEHER y WETTSTEIN³; como ellos, y basados en experimentos anteriores, utilizamos la hidrólisis ácida, que prolongamos 48 horas, por considerar que aumentamos así en un 20 por 100 la cantidad de hormona liberada; la extracción la practicamos con cloroformo en varias veces, añadiendo la primera porción inmediatamente después de acidificar, logrando así una extracción continua del esteroide que se va liberando.

Los lavados del cloroformo se practican con álcali y agua, pero prescindimos de la larga y penosa reextracción de los líquidos de lavado una vez que pudimos demostrar que lo perdido en esta porción era despreciable (menor del 4 por 100).

Sobre el extracto seco, y por razones de reproducibilidad y conveniencia, procedemos a una primera cromatografía sobre columna de Florisil, lo que nos proporciona un extracto mucho más puro y manejable sin aumentar de manera notable a la pérdida total.

Utilizamos para la individualización cromatográfica los dos mismos métodos usados inicialmente por los autores suizos: tolueno/propilen glicol de Zaffaroni, y metanol/agua/tolueno/acetato de etilo de Bush, practicando la elución del papel de manera algo diferente y una fotografía con luz ultravioleta de los cromatogramas, que nos proporciona un documento de indudable importancia.

El último paso de nuestro método difiere del utilizado por los mencionados autores, pues mientras éstos se limitan a pulverizar el papel del último cromatograma con una solución alcalina de azul de tetrazolio comparando la cantidad problema con cantidades conocidas de hidrocortisona que se han hecho correr en el cro-

matograma, nosotros eluimos el esteroide del papel para llevar a cabo la reacción en el tubo y leerla en el espectrofotómetro.

El inconveniente más serio con el que esta reacción tropieza es su falta de especificidad, puesto que aunque tenemos las razones anteriormente enumeradas para considerar que lo que existe en la banda que corre con la hidrocortisona en el segundo cromatograma es aldosterona y nada más que aldosterona, ciertos datos de observación reciente¹¹ y¹⁰ nos hacen temer que en condiciones especiales pueda no ser suficiente la individualización realizada.

Otro inconveniente que también merece ser mencionado es la inconstancia de los blancos de papel, que sólo se consigue atenuar en parte por la previa extracción en el Soxhlet, pero que queda minimizada por el hecho de correr en todos los casos el blanco de papel correspondiente a cada fracción final.

Finalmente, y para cerrar estos comentarios, queremos hacer hincapié sobre un punto que conviene tener presente para la aplicación de los resultados obtenidos por este método a la investigación clínica, y éste es que, aun aceptando que la recuperación de aldosterona urinaria sea constante, es decir, que las pérdidas del método sean siempre las mismas, asumimos que una cantidad fija de la aldosterona segregada por la suprarrenal es eliminada como tal aldosterona por la orina y que nuestra hidrólisis libera en proporción constante la hormona conjugada.

La escasa información sobre este particular que hasta la fecha tenemos¹⁰ no nos permite adoptar una actitud definida frente a este problema; sin embargo, la buena correlación clínica que en líneas generales hemos obtenido con este método y el acuerdo existente entre los valores basales que nosotros obtenemos y los publicados por otros, utilicen éstos un método químico o biológico, nos animan a seguir nuestro trabajo teniendo siempre presente un punto de gran importancia, y es que la confianza que podemos poner en los resultados obtenidos aumenta mucho si utilizamos los sujetos sobre los que se va a hacer un estudio metabólico o una prueba terapéutica como sus propios controles y si utilizamos grupos de valores en vez de determinaciones aisladas. Esto, sobre todo, cuando los valores sean bajos, pues en esta zona es donde las interferencias pueden, afectando la lectura colorimétrica, falsear más fácilmente los resultados.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Normales. — La eliminación de aldosterona urinaria en los sujetos normales encontrada con nuestro método es equiparable a la encontrada por otros autores que utilizan también un método químico y algo más elevada en líneas generales que la que dan aquellos que basan la

cuantitación final en un procedimiento biológico^{12, 13} y¹⁴. Creemos conveniente insistir en la ocurrencia eventual de cifras elevadas que no pueden ponerse en relación con influencias externas del tipo que actualmente consideramos influyen sobre la secreción de aldosterona.

Enfermedades primitivas de las cápsulas suprarrenales. — Los resultados obtenidos en un síndrome adrenogenital que se acompañaba de alteraciones en el metabolismo del sodio, un feocromocitoma, un Addison y dos síndromes de Cushing, demuestran una buena correlación clínica y confirman resultados publicados anteriormente.

Especial interés tiene el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario¹⁵, imposible de hacer de no contar con un método para la determinación de aldosterona, aunque pueda sospecharse por el cuadro clínico y las distintas determinaciones analíticas de uso más corriente.

Enfermedades del grupo de los hiperaldosteronismos secundarios. — Hemos podido confirmar el aumento de aldosterona en los nefróticos en fase de retención, enfermos en los que por primera vez se demostró la existencia de un principio retenedor de sodio en la orina¹⁶ y también de cuya orina por primera vez se consiguió obtener aldosterona pura cristalizada¹⁷, identificando así estos dos importantes factores: También hemos podido comprobar la vuelta a la normalidad de los valores de aldosterona en las fases de remisión espontánea o inducida de la enfermedad.

El papel de la aldosterona en los edemas de los cardíacos ha sido sometido recientemente a revisión^{18, 19} y¹; indudable en algunos casos, en otros existirían factores de mayor importancia, no actuando la aldosterona sino en un papel secundario. En los casos por nosotros estudiados, la aldosterona se encontró elevada en aquellos que se encontraban en franca situación de insuficiencia congestiva, si bien conviene hacer notar que las determinaciones se hicieron cuando se hallaban sometidos a un régimen pobre en sodio, suficiente ya de por sí para elevar la eliminación de aldosterona a las cifras por nosotros encontradas. En uno de los casos las cifras descendieron a límites normales al compensarse con el tratamiento médico. También dentro de valores normales se encuentran los resultados de un tercer enfermo con una doble cardiopatía aórtica que, aunque clínicamente compensado mientras guardaba reposo absoluto, presentaba disnea intensa con esfuerzos pequeños.

Hemos incluido la hipertensión esencial entre los hiperaldosteronismos pese a no haberse confirmado hasta la fecha la teoría de GENEST y colaboradores²⁰ de considerar esta enfermedad como producida por un aumento de la secreción de aldosterona pequeño, pero constante. La ma-

yor parte de los investigadores sólo encuentran cifras altas de aldosterona urinaria en estos pacientes cuando están sometidos a un régimen pobre en sodio o en aquellos que presentan signos de insuficiencia cardíaca congestiva; nosotros tampoco hemos hallado aumento en los dos casos estudiados.

Embarazo. — Consideramos interesante la demostración del incremento en la secreción de aldosterona durante el embarazo en un caso cuya eliminación basal figuró inicialmente entre nuestros valores normales y cuyas cápsulas suprarrenales sabemos, por la prueba de estimulación con ACTH, respondían normalmente desde el punto de vista de los cetos e hidroxis. Este aumento, por otra parte, ha sido señalado también en diversas observaciones²¹.

En las cirrosis hepáticas con edemas y ascitis la aldosterona urinaria se encuentra muy elevada; este hecho, ya conocido desde hace un cierto tiempo²², hemos podido comprobarlo ampliamente en las numerosas determinaciones efectuadas en un número reducido de enfermos. ¿Cuál es el papel que la aldosterona desempeña en los edemas de los enfermos con cirrosis? y ¿a qué se debe el aumento en la eliminación de esta hormona? Juntamente con las demás posibles causas de los edemas en estos pacientes, forman parte de un trabajo actualmente en preparación.

COMENTARIOS A LAS VARIACIONES EN LA ELIMINACIÓN DE ALDOSTERONA QUE ACOMPAÑAN A LA RESTRICCIÓN DE SODIO EN LA DIETA Y A LA REDUCCIÓN DE LOS LÍQUIDOS EXTRACELULARES.

Como otros autores²³ y²⁴, hemos podido confirmar que la restricción en la dieta se acompaña de un aumento en la eliminación de aldosterona urinaria, aumento que en la mayor parte de los casos (ver fig. 4) sólo se hace patente a los dos o tres días de haber sido restringido el sodio en la dieta cuando el sujeto se encuentra en un balance negativo de este catión y ha perdido peso de una manera notable; todo ello probablemente reflejo de una disminución en el volumen de los líquidos extracelulares o en una porción determinada de ellos, estímulo adecuado, según actualmente se piensa²⁵, para la puesta en marcha del aumento de la secreción de aldosterona.

Sabido¹⁰ que la acción de un diurético del tipo del Diamox tomado en el día mismo de empezar la prueba, al producir una natriuresis intensa precipitaba la respuesta suprarrenal; hemos llevado a cabo el mismo experimento variando las condiciones y utilizando, en lugar de un inhibidor de la resorción de sodio, un inhibidor de la secreción de la hipófisis posterior: el alcohol. Como es sabido éste, en determinados sujetos, produce una intensa poliuria acuosa. En estas condiciones hemos logrado obtener una respon-

ta más precoz e intensa de la eliminación de aldosterona, en gran parte superponible a la obtenida con el uso del diurético; un argumento más a favor de la regulación volumétrica de la secreción de aldosterona.

La administración de un diurético mercurial a un sujeto con cirrosis hepática y niveles muy elevados de aldosterona urinaria nos permitió delimitar la relación estrecha entre la magnitud de la diuresis de sodio y de agua y la respuesta suprarrenal.

La interpretación del aumento de la aldosterona urinaria provocado por la sudoración producida al practicar un ejercicio físico violento, puede ponerse en relación con la reducción en los líquidos extracelulares lograda a través de una sudoración lo suficientemente intensa para producir una pérdida de peso objetivable²⁶; también, sin embargo, se puede poner en relación con el "stress" producido por el esfuerzo físico, sumado sobre todo a la tensión psíquica producida por el interés de la partida²⁷.

COMENTARIOS SOBRE EL PAPEL DE LA HIPÓFISIS ANTERIOR EN LA SECRECIÓN DE ALDOSTERONA Y LOS EFECTOS DEL ACTH.

Sigue siendo muy discutido el papel de la hipófisis anterior en la regulación de la secreción de aldosterona por la cápsula suprarrenal. Parece indudable que su acción no es tan directa y evidente como la ejercida sobre los otros esteroides también producidos por aquella glándula de secreción interna (17-hidroxis y 17-cetos), y aunque es muy verosímil que juegue un importante papel en la secreción de aldosterona, en ningún modo sería el único estímulo para su producción.

Existe una cierta discordancia entre los experimentos realizados por los distintos autores, y mientras algunos consideran que la secreción de aldosterona es en todo punto independiente de la función hipofisaria, otros afirman que está también sometida a la influencia de aquélla¹ y²⁸. Muchos de los estudios hasta ahora efectuados han sido realizados en sujetos diagnosticados de hipopituitarios; otros, en enfermos en quien se había practicado una hipofisección más o menos completa. La cualificación del grado en que estaba afectada la función hipofisaria e hipotalámica de cada uno de estos sujetos es prácticamente imposible y en ello quizás radique la causa de la dificultad en comparar los resultados publicados por distintos investigadores. Las dos tendencias opuestas vienen resumidas en los esquemas de la figura 6; dos enfermos que clínicamente y analíticamente padecían un síndrome hipopituitario presentan una respuesta diametralmente opuesta a la restricción del sodio en la dieta; mientras que uno de ellos responde rápidamente a la disminución en la ingesta de sodio con un incremento en la producción de al-

dosterona, el otro, que mantenía en condiciones normales un buen balance, no puede aumentar la secreción de esta hormona y entra en un balance negativo que le conduce a una situación clínica que obliga a suspender la prueba sin que, a pesar de una pérdida de 2 kilos de peso y de un total de 220 mEq. de sodio, la cifra de aldosterona consiga rebasar los valores basales.

En nuestro sentir, las diferencias entre uno y otro caso dependen probablemente del grado de afectación hipotalámico hipofisario, más profundo en el primer caso que en el segundo.

Consideramos la primera paciente como una prueba evidente de lo que hemos dado en llamar "la acción permisiva" de una hipófisis anterior sana sobre la secreción de aldosterona. La hipófisis no lo es todo, pero si es necesaria su acción trófica para que puedan actuar los mecanismos homeostáticos que de manera directa regulan la secreción de esta hormona.

El problema de las alteraciones en la secreción de aldosterona por la administración de ACTH ha dado lugar también a controversias considerables. En los últimos tres casos por nosotros estudiados hubo en todos una elevación de magnitud distinta, pero siempre aceptable, en los días de la estimulación, siendo sobre todo notable el descenso evidente que la secreción de esta hormona presentó en los días siguientes a la administración de ACTH. Merece especial mención por lo marcado el incremento obtenido en el sujeto afecto de hipopituitarismo; el tipo de respuesta en él logrado recuerda el producido en ratas hipofisectomizadas en las que se había dejado transcurrir antes de la estimulación con ACTH el tiempo suficiente para que se produjera una atrofia anatómica de la suprarrenal; en ellas, como este caso, el aumento de aldosterona fué tan marcado como el obtenido de los otros corticoides en cifras absolutas y mucho mayor proporcionalmente. En nuestra opinión, esto apoya la teoría del grupo de Ginebra²⁹, que defiende la estimulación directa de la secreción de aldosterona por el ACTH que queda enmascarada por las alteraciones en el equilibrio hidrosalino producidas por el aumento de las otras hormonas, segregadas habitualmente en cantidad mucho mayor por la suprarrenal. Este experimento demostraría a la vez que la secreción de aldosterona no depende exclusivamente, como la de los otros esteroides, de la producción de ACTH por la hipófisis anterior, y al mismo tiempo que su secreción, si se deja influir de manera directa por la fracción del lóbulo anterior de la hipófisis más o menos purificada que en el comercio se expende como ACTH, acción directa muy visible en este caso en el que el escaso aumento en los 17-hidroxicorticoides obtenido con sólo dos días de estimulación no llegó a ocasionar alteraciones suficientes en el equilibrio iónico para que pudieran influir con signo contrario sobre la secreción de aldosterona.

RELACIÓN ENTRE LA ELIMINACIÓN DE SODIO Y POTASIO EN LA ORINA, SU COCIENTE Y LA ALDOSTERONA URINARIA.

Como ha sido señalado¹ en líneas generales, la disminución del sodio en la orina acompañada de un aumento absoluto o relativo del potasio urinario suele asociarse a un nivel elevado de aldosterona en la orina. Existen, sin embargo, excepciones a esta regla; de ellas, una de las más características es la situación creada por la administración de un diurético (mercurial, Diamedox), aunque ésta no es la única ocasión en que puede coexistir una eliminación elevada de sodio con una cifra alta de aldosterona, puesto que esto mismo ocurre en la nefritis, que pierde sal, y en los aldosteronismos primarios. Puede también suceder el caso inverso, cifra baja de sodio urinario con inversión del cociente Na/K sin acompañarse de aumento de la aldosterona urinaria por producción excesiva endógena de otra hormona también capaz de retener el sodio (síndrome de Cushing, estimulación con ACTH) o por la administración con fines terapéuticos de un medicamento, una de aquellas hormonas o alguno de sus derivados sintéticos (fluorohidrocortisona), más activos todavía desde el punto de vista de la retención de sodio.

Finalmente, quedan casos más difíciles de explicar en que el sodio eliminado es bajo y la aldosterona también, sin que se pueda invocar la acción de ninguna hormona o fármaco de los más arriba mencionados; estos casos nos sirven para recordar que hay otra serie de factores cuya influencia sobre la eliminación del sodio se ha demostrado y cuya importancia no se puede despreciar.

RESUMEN.

El trabajo comprende tres partes. En la primera se describe un método físico-químico para la determinación de aldosterona en la orina, cuya complejidad le hace poder ser empleado únicamente como instrumento de investigación; a este respecto, su utilidad parece innegable. En la segunda parte se enumeran y analizan los resultados obtenidos en distintos casos normales y patológicos. Finalmente, en la tercera se hacen los comentarios pertinentes a la interpretación de las pruebas que sobre los mecanismos fisiológicos de la secreción de aldosterona se han realizado.

Queremos agradecer la dirección y ayuda prestada a la consecución de este trabajo, en primer lugar, a don CARLOS JIMÉNEZ DÍAZ, director del I. I. C. M. y de la Clínica de Nuestra Señora de la Concepción, donde fueron realizados los estudios más arriba mencionados. A los doctores CASTRO MENDOZA y VIVANCO, jefes de los Departamentos de Bioquímica y Hormonas, respectivamente, en los que se llevó a cabo nuestro trabajo y, finalmente, a los demás doctores de la Clínica que nos permitieron estudiar los enfermos a su cuidado.

BIBLIOGRAFIA

- L. HERNANDO AVENDAÑO.—Aldosterona, Fisiopatología y Clínica. *Prog. Pat. Clín.*, 4, 1, 1957.
- DEMING, Q. B. y LUETSCHER, J. A. Jr.—Bioassay of deoxycorticosterone like material in urine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73, 171, 1950.
- NEHER, R. y WETTSTEIN, A.—Physicochemical detection and measurement of Aldosterone in body fluids and tissues. *Acta Endocrinol.*, 18, 386, 1955.
- NOWACZYSKI, W., GOLDNER, M. y GENEST, J.—Microdetermination of corticosteroids with tetrazonium derivatives. *J. Lab. and Clin. Med.*, 45, 818, 1955.
- SIMPSON, S. A. y TAIT, J. F.—Physicochemical method of detection of previously unidentified adrenal hormones. *Mem. Soc. Endocrinol.*, 2, 9, 1953.
- SIMPSON, S. A., TAIT, J. F., WETTSTEIN, A., NEHER, R., VON EUW, J., SCINDLER, O. y RECHSTEIN, T.—Aldosterone, Isolierung und Eigenschaften. Über Bestandteile der Nebennierende und verwandte Stoffe. *Helv. Chem. Acta*, 37, 1.163, 1954.
- CLARKE, I.—A colorimetric reaction for the estimation of cortisone, hydrocortisone, aldosterone and related steroids. *Nature*, 175, 123, 1955.
- BUSH, I.—Methods of paper chromatography of steroids applied to the study of steroids in mammalian blood and tissues. *Biochem. J.*, 50, 370, 1952.
- ZAFFARONI, A., BURTON, R. B. y KEDRMAN, E. H.—Adrenocortical hormones analysis by paper partition chromatography and occurrence in the urine of normal persons. *Science*, 111, 6, 1950.
- HERNANDO, L., CRABBE, J., ROSS, E. J., REDDY, W. J., REYNOLD, A. E., NELSON, D. H. y THORN, G. W.—Clinical experience with a physicochemical method for estimation of aldosterone in urine. *Metabolism*, 6, 6, 1957.
- NOWACZYSKI, W., STEYERMARK, P. R., KOIW, E., GENEST, J. y JONES, R. M.—A detailed study of a purified urinary aldosterone fraction. *Canad. J. Biochem. & Physiol.*, 34, 1.023, 1956.
- NEHER, R. y WETTSTEIN, A.—Physicochemical estimation of aldosterone in urine. *J. Clin. Inv.*, 35, 800, 1956.
- AXELRAD, B. J., CATES, J. E., JOHNSON, B. B. y LUETSCHER, J. A. Jr.—Bioassay of mineralocorticoids: Relationship of structure to physiological activity. *Endocrinology*, 55, 56, 1954.
- LIDDLE, G. W., GORFIELD, J., GASTER, A. C. T. y BARTTER, F. C.—The physiological basis for a method assaying aldosterone in extracts of human urine. *J. Clin. Inv.*, 34, 1.410, 1956.
- CONN, J. W.—Presidential Address Central Society for Clinical Research. Primary Aldosteronism, a new clinical syndrome. *J. Lab. and Clin. Med.*, 45, 3, 1955.
- LUETSCHER, J. A. Jr. y JOHNSON, B. B.—Chromatographic separation of the sodium retaining corticoid from urine of children with nephrosis compared with observations on normal children. *I. Chim. Invers.*, 33, 276, 1954.
- LUETSCHER, J. A., NEHER, R. y WETTSTEIN, A.—Isolation of crystalline aldosterone from the urine of a nephrotic patient. *Experientia*, 10, 56, 1954.
- MULLER, A. F., RIONDEL, A. M., MANNING, E. L. y MACH, R. S.—Etude de l'aldosteronurie chez le sujet normal et le cardiaque oedemateux. I. Effets des variations de l'apport de chlorure de sodium. *Schweiz. Med. Wchnschr.*, 47, 1.355, 1956.
- WOLFF, H. P.—Comunicación al Symposium sobre aldosterona. Ginebra, mayo 1957.
- GENEST, J., LEMIEUX, G., DAVIGNON, A., KOIW, E., NOWACZYSKI, W. y STEYERMARK, Y.—Human arterial hypertension: a state of mild hyperaldosteronism. *Science*, 123, 503, 1953.
- MARTIN, J. D. y MILLS, I. H.—Aldosterone secretion in normal and toxæmic pregnancies. *Brit. M. J.*, 2, 571, 1956.
- LUETSCHER, J. A. Jr. y AXELRAD, B. J.—Increased aldosterone output during sodium deprivation in normal men. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 87, 650, 1954.
- DUNCAN, L. E., LIDDLE, G. W. y BARTTER, F. C.—The effect of changes in body sodium, on extracellular fluid volume and aldosterone and sodium excretion by normal and edematous men. *J. Clin. Inv.*, 25, 1.299, 1956.
- BARTTER, F. C., LIDDLE, G. W., DUNCAN, L. E. y DELEA, C.—The role of extracellular fluid volume in the control of aldosterone secretion. *J. Clin. Inv.*, 35, 688, 1956.
- FALLBRIARD, A., MULLER, A. F., NEHER, H. y MACH, R. S.—Etudes des variations de l'aldosteronurie sous l'effet des surcharges en potassium et des déperditions rénales et extrarenales d'eau et de sel. *Schweiz. Med. Wchnschr.*, 85, 1.218, 1956.
- RICHARDSON, HILL JR., GOETZ, F. C., FOX, H. H., MUROWSKI, B. J., KRAKAUER, L. J., REINFENSTEIN, R. W., GRAY, S. J., REDDY, W. J., HELDBERG, S. E., ST. MARC, J. y THORN, G. W.—Studies on adrenocortical and psychological response to stress in man. *Arch. Int. Med.*, 97, 3, 1956.
- LIDDLE, G. W., DUNCAN, L. y BARTTER, F. C.—Dual mechanism regulating adrenocortical function in man. *Am. J. M.*, 21, 380, 1956.
- MULLER, A. F., RIONDEL, A. y MANNING, E.—Effect of corticotrophin on secretion of aldosterone. *Lancet*, 2, 1.021, 1956.

SUMMARY

The paper includes three parts: The first deals with a physico-chemical method for the assay of aldosterone in the urine; this method is so complex that it can only be used as a research tool; its usefulness in this field appears to be unquestionable. In the second part the results attained in different cases, normal and pathological, are enumerated and analysed. Finally, the comments bearing on the interpretation of the tests that have been carried out on the physiological mechanisms of aldosterone secretion are made in the third part.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Beitrag besteht aus drei Teilen: im ersten wird eine physikalisch-chemische Methode zur Bestimmung von Aldosteron im Harn beschrieben, welche aber wegen ihrer Umständlichkeit bloss für Forschungszwecke in Frage kommt; auf diesem Gebiete ist sie hingegen

zweifellos von grossem Werte. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse bei verschieden normalen und pathologischen Fällen aufgezählt und eingehend überprüft; der dritte Teil bringt schliesslich einschlägige Bemerkungen zur Deutung der Proben, die über die physiologischen Mechanismen der Aldosteronausscheidung angestellt wurden.

RÉSUMÉ

Le travail comprend trois parties: dans la première on décrit une méthode physico-chimique pour la détermination d'aldostérone dans l'urine, dont la complexité le rend utilisable uniquement comme instrument d'investigation; à ce sujet son utilité semble indéniable. Dans la seconde partie on énumère et analyse les résultats obtenus dans différents cas normaux et pathologiques. Finalement, dans la troisième partie on fait les commentaires pertinents à l'interprétation des preuves que sur les mécanismes physiologiques de la sécrétion d'aldostéron ont été réalisées.

DOS CASOS DE GARGOILISMO. CONSIDERACIONES SOBRE EL PROTEINOGRAMA EN EL SÍNDROME DE HURLER

A. BALCÉLLS-GORINA, E. SÁNCHEZ VILLARES,
J. ESCRIBANO y A. LÓPEZ BORRASCA.

Clinica de Patología General (Profesor: Doctor BALCÉLLS) y de Pediatría de Salamanca (Profesor: Doctor ARCE).

Instituto de Investigaciones Clínicas (Exema. Diputación de Salamanca).

Unos 200 casos de esta enfermedad han sido publicados hasta el presente en la literatura médica. En España, que sepamos, sólo han aparecido las comunicaciones de ARCE y VÁZQUEZ (1949) aportando dos casos y de SUÁREZ (1955) presentando otro.

Dada la gran rareza de este proceso y su desconocimiento en el diagnóstico, confundido a veces con otras disostosis o con el cretinismo, nos ha parecido interesante presentar las siguientes observaciones personales, que añaden además algunos datos al conocimiento de la bioquímica plasmática de la enfermedad.

CASUÍSTICA.

Caso 1. A. M. M., varón de cuatro años y un mes, natural de Quintana de la Serena (Badajoz). Fecha de la primera observación: 3-X-1956.

Antecedentes familiares. — Padre de treinta y seis años, sano. Madre de veintiocho años, sana. Son consanguíneos en grado de primos hermanos. El niño es el se-

gundo de dos. El primero falleció a los cinco meses de proceso calificado de meningitis. No se registran, entre los ascendientes inmediatos, antecedentes de malformación similar.

Antecedentes personales. — Embarazo, bueno. Parto, normal y a término. Lactancia materna un mes. Después artificial, con leche en polvo, mal reglamentada.

Retraso en el comienzo de la dentición: primeras piezas a los dieciocho meses. Retraso en la iniciación y posterior desarrollo de funciones estáticas y psíquicas. Comenzó a sostenerse sentado a los dieciocho meses; primeros pasos, a los veinticuatro meses; la marcha ha sido siempre poco estable, con muy frecuentes caídas. No conoció a las personas que le rodeaban hasta los dieciocho meses. Primeros monosílabos a los dos años; lenguaje actual, escaso en vocabulario. Dicen los familiares que es muy afectivo y que tiene buena memoria.

A raíz de los dos meses, procesos febriles aislados, frecuentes, con duración breve, y durante los cuales tenía tendencia a estados "colapsales" y con frecuencia se quedaba apneico y cianótico. A los cinco meses fué adenoidectomizado. A los nueve meses desapareció la tendencia citada.

Desde el mismo nacimiento les sorprendió a los padres su especial fisonomía. Más tarde les llamó la atención el retraso motor, psíquico e intelectual. Actualmente les preocupa su retraso en el crecimiento.

Exploración. — Coloración normal de piel, pigmentada por exposición a sol en partes descubiertas; grado de humedad, normal. Muy marcada hipertricosis en dorso de espalda y brazos. Mucosas de coloración normal.

Aspecto corporal llamativo por su retraso estatural y característica facies. Rostro ancho, inserción baja del cabello, cejas muy pobladas, depresiones supraorbitarias, nariz chata deprimida en su base. Distancia interorbitaria: 4 cm. Globos oculares grandes, proyectantes. Labios gruesos. Prognatismo de maxilar superior y maxilar inferior recogido. En general, la facies es tosca y grosera, típica de gargoilismo (fig. 1).

Dientes pequeños, irregularmente implantados, con caries (incisivos medios superiores casi destruidos). Encías