

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Radioinmunoensayo de aldosterona en plasma periférico y
su aplicación clínica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José María Sancho Rof

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5331115121

T
577.185.53
SAN

RADIOINMUNOENSAYO DE ALDESTERONA

EN PLASMA PERIFERICO

Y SU APLICACION CLINICA

TESIS DOCTORAL

J.M.SANCHO ROF

615734250

47467733

PRESENTADA POR EL

Prof. Dr. A.Fernández Cruz

DONACIÓN DE:
D. JORGE TAMARIT TORRES

MADRID

1972



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
BIBLIOTECA

	<u>PAGINA</u>
<u>INTRODUCCION GENERAL</u>	
1 - Alteraciones de la secreción de Aldosterona	2
2 - Introducción a los métodos de cuantificación de Aldosterona	22
3 - Introducción a los métodos diagnósticos de hiperaldosteronismos	32
4 - Introducción a los mecanismos de regulación de la secreción de Aldosterona	40
<u>A-PARTE I.- DESARROLLO DEL METODO DE RADIOINMUNOENSAYO.</u>	
<u>RESULTADOS EXPERIMENTALES.</u>	
Reactivos y aparatos	49
A-1 <u>Introducción metodológica. Radioinmunoensayo</u>	58
a- Condiciones de separación de fracciones libre y unida	61
i-Comparación entre distintos recubrimientos de carbón activado	63
ii-Comparación de condiciones de agitación del sistema adsorbente	64
iii-Condiciones de tiempo de equilibrio y temperatura del sistema de separación	67
iv-Comparación de distintas concentraciones de adsorbente. Longevidad de la suspensión	70
b- Condiciones de equilibrio de antisuero y esteroide	71
i-Tiempo de equilibrio antisuero 088...	73
c- Estudio de la interferencia en el sistema de distintos tratamientos de tubos R.I.E.	
i-Efecto de lavado con ácido	75
ii-Comparación entre distintos sistemas de lavado	76

PAGINA

<u>A-2 Estudio de antisueros antialdosterona y antialdosterona-lactona</u>	
a- Método de formación de antisueros	78
b- Titulación de antisueros	79
c- Estudio de longevidad de diluciones antisueros.	
i- Antisuero 138	80
ii- Antisuero 088	82
d- Estudios de adición de γ globulina inerte	
i-Adición suero inerte a antisuero 137..	84
ii-Adición γ globulina a antisuero 137..	86
iii-Afinidad de γ globulina y Aldosterona	88
e- Especificidad de antisueros. Reacciones cruzadas	90
<u>A-3 Estudio de métodos de purificación</u>	
a- Extracción.	
i-Relación volumen CH_2CL_2 /plasma	112
ii-Lavado de CH_2CL_2	113
b- Partición. Comparación de distintos sistemas	113
c- Estudio de sistemas cromatográficos.	
i-Sistemas cromatográficos	116
ii-Separación de Aldosterona y Cortisol, pérdidas de Aldosterona en distintos sistemas cromatográficos	118
iii-Comparación de 1 ó 2 desarrollos en Sistema A	121
iv-Dispersión de Aldosterona en sistema A	123
v- Dispersión de Aldosterona en sistema B	124
vi-Separación de esteroides en sistema A	124

	<u>PAGINA</u>
vii-Separación de esteroides en sistema B	127
viii-Interferencia de Cortisol y Cortisona en sistema B	127
ix-Interferencia de Cortisol en sistema A	133
x-Estudios de purificación en sistema de columna de Silica Gel	134
 <u>A-4 Protocolo definitivo del método</u>	
a- Reactivos y disoluciones	139
b- Extracción	142
c- Partición	144
d- Cromatografía en capa fina	144
e- Radioinmunoensayo	
i-Equilibrio	146
ii-Separación	148
f- Cálculos	150
g- Ejemplo de curva estandar y del cálculo de concentración de Aldosterona	153
 <u>A-5 Resultados experimentales</u>	
a- Pérdidas de Aldosterona en el procedimiento	160
b- Precisión y exactitud. Desviación estandar, coeficiente de variación y límites de confianza del método	160
c- Especificidad. Blancos reactivo, blancos de plasma pre-extractado y plasma de adrenalectomizado	162
d- Medición comparativa de especímenes de plasma de vena adrenal cuantificados por el método de Tait	164
e- Reproducibilidad de la curva estandar..	165

PAGINA

B-PARTE II.- ESTUDIOS CLINICOS

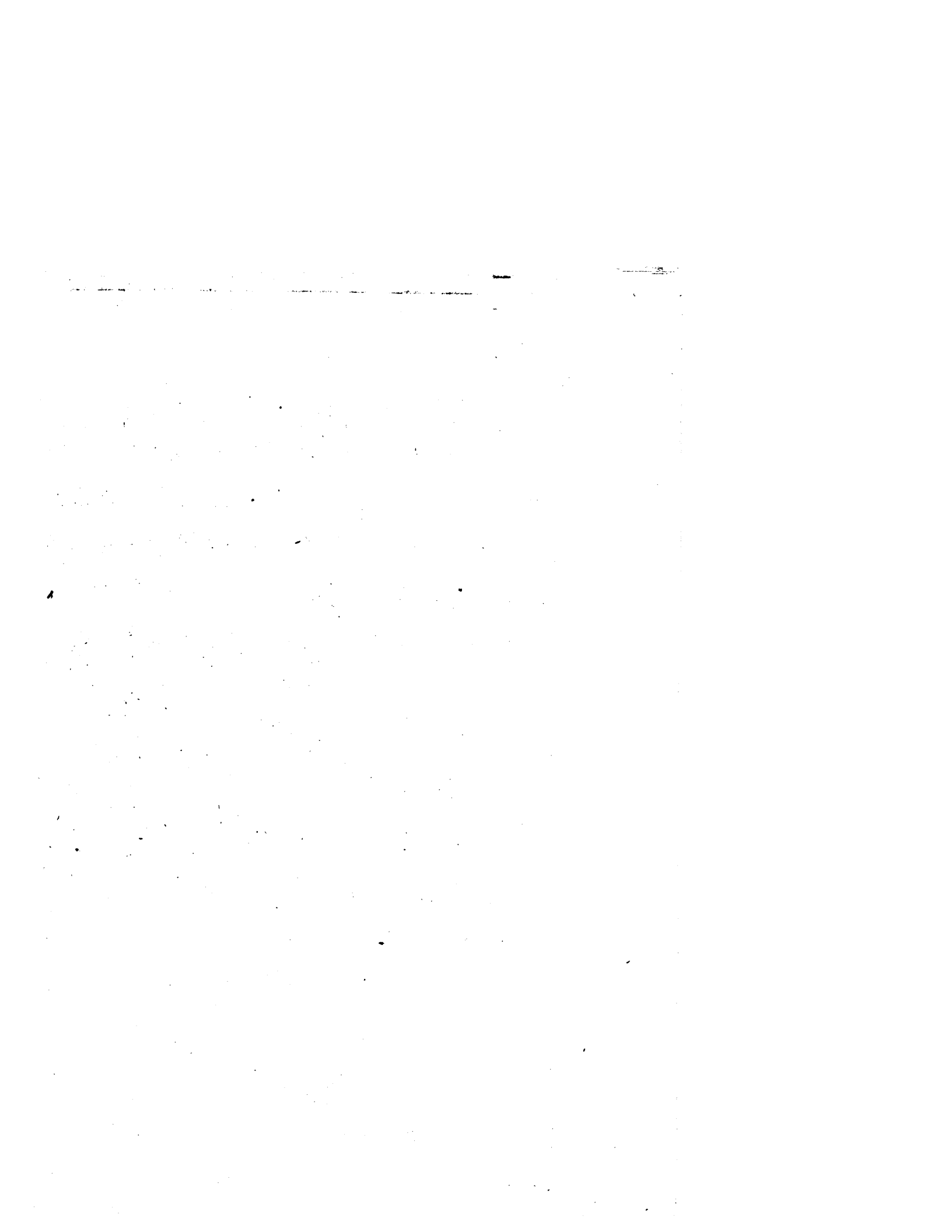
Métodos	170
<u>B-1 Determinación de valores normales. Estudios posturales y de sobrecarga y depleción salina. Variación diurna.</u>	
a- Protocolo estudio postural	174
b- Protocolo estudio sobrecarga y depleción	175
c- Protocolo estudio variación diurna	176
d- Resultados estudio postural	178
e- Resultados estudio sobrecarga y depleción	178
f- Resultados estudio variación diurna ...	179
<u>B-2 Estudios de supresión con mineralocorticoides de niveles plasmáticos de Aldosterona. Diagnóstico diferencial entre hiperaldosteronismo 1° y 2°.</u>	
a- Protocolos clínicos	
i-Normales. Supresión con Fluorinef y DOCA	189
ii-Hiperaldosteronismos 1° y 2° Supresión con Fluorinef y DOCA	189
b- Resultados	
i-Normales	193
ii-Hiperaldosteronismos 1° y 2°	194
<u>B-3 Estudios de regulación de niveles plasmáticos de Aldosterona en pacientes anéfricos.</u>	
a- Protocolos clínicos	
i-Estudio postural y de depleción salina	207
ii-Estudio de cateterización y estimulación	208

PAGINA

b- Resultados	
i-Depleción salina	209
ii-Cambio postural	209
iii-Cateterización y estimulación	210

DISCUSION DE RESULTADOS

1 - Método de determinación de la concentración de Aldosterona en plasma periférico por radioinmunoensayo	219
2 - Niveles plasmáticos de Aldosterona en sujetos normales, cambio postural, sobrecarga y depleción salina, variación diurna	229
3 - Supresión con Fluorinef y DOCA de niveles plasmáticos de Aldosterona en sujetos normales, hiperaldosteronismo 2º y 1º Diagnóstico diferencial	237
4 - Regulación de niveles de Aldosterona en pacientes anéfricos	245
<u>CONCLUSIONES</u>	250
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	254



I N T R O D U C C I O N

RECONOCIMIENTOS

Mi agradecimiento a las personas e Instituciones que han contribuido a la realización de este trabajo.

Profesor J.C. Melby, Jefe del Departamento de Endocrinología del Boston University Medical Center.

Profesor M. St.Cyr, de los Departamentos de Bioquímica y Medicina de la Boston University Medical School.

Profesor A. Fernández Cruz, Catedrático de Patología General de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

INTRODUCCION GENERAL

1 - ALTERACIONES DE LA SECRECION DE ALDOSTERONA

La historia del estudio clínico de la hormona Aldosterona, comienza en 1927 cuando se obtuvieron los primeros extractos adrenocorticales y cuando por primera vez se relacionaron la insuficiencia suprarrenal con el papel del metabolismo del sodio. En 1932 G.W. Thorn presentó por primera vez en la convención de la American Medical Assoc. dos gatos adrenalectomizados, que tratados con extracto suprarrenal presentaban balance electrolítico normal.

Posteriormente, se logró sintetizar el mineralocorticoide Desoxicorticosterona (DOCA), que fue utilizado en su forma de acetato como parte del tratamiento de la insuficiencia suprarrenal, viéndose que producía la corrección de pérdida de sodio, disminuyendo el nivel de potasio plasmático y elevando la tensión arterial (1). Ferrelue y col. (2) observaron que un exceso de desoxicorticosterona producía hipertensión y pérdida de potasio, a la vez que poliuría y polidipsia resistentes al efecto de la vasopresina.

Con estas descripciones, quedaron establecidos los signos y síntomas de exceso de mineralocorticoides, describiéndose los efectos fisiológicos básicos y quedaron completadas con la observación de Relman y Schwartz (3) del llamado mecanismo de escape, observando que en sujetos normales, se produce un fenómeno de readaptación al efecto crónico de mineralocorticoides, escapando del efecto de retención sódica, aunque continuando con la pérdida de potasio.

Con estas observaciones, comenzó a buscarse la sospechada hormona natural con propiedades predominantemente reguladoras del metabolismo del sodio, demostrándose en orina un factor con la propiedad de retener sodio.

Luetcher en 1956 (4) demostró que este factor estaba presente en grandes cantidades en sujetos con procesos como nefrosis, cirrosis e insuficiencia cardiaca congestiva, estando también presente dicho factor en la orina de sujetos normales, aunque en mucha menor cantidad.

Posteriormente, Laragh y col. en 1955 (5) y Johnson et al. en 1957 (6) demostraron que la ingestión de potasio tenía un efecto contrario en la excreción de este factor naturrético que la ingestión de sales sódicas.

Después de múltiples investigaciones destinadas a identificar este factor urinario, con propiedades de retención salina y el factor suprarrenal con las mismas propiedades denominado electrocortina, en 1953 James Tait, Sylvia Sison y colaboradores (7), lograron aislar electrocortina cristalizada, haciéndola así utilizable para su análisis estructural. En su descripción original, indicaban que "la degradación química del nuevo mineralocorticoide cristalino, provisionalmente llamado electrocortina, muestra que este compuesto es 11 B, 21-dihidroxi-3, 20-diceto-4-pregnen-18 aldehído. En disolución, reacciona principalmente como II-hemiacetal. Sugerimos Aldosterona como nombre definitivo para este compuesto".

Casi simultáneamente, Luetscher et al. (8) lograron aislar el nuevo compuesto Aldosterona, en forma cristalina de la orina de un niño con síndrome nefrótico, quedando así establecida definitivamente la identidad de los antiguamente denominados factor urinario y electrocortina.

Entonces, comenzó la búsqueda de situaciones patológicas con hiperproducción de mineralocorticoides, en particular Aldosterona.

Aún antes de que Conn describiese el síndrome que lleva su nombre, diversos investigadores habían tratado enfermos con los signos de hiperaldosteronismo primario, aunque hasta entonces la patología básica del síndrome se pensó que estaría radiacada en el riñón.

Conn examinó concentraciones de electrolitos en la saliva de enfermos con los signos de exceso de Aldosterona y encontró que de manera sistemática existía un cociente Na/K bajo, estableciendo una confirmación más directa, al encontrar elevados niveles urinarios de factor productor de retención sódica en la orina de estos enfermos, por medio de un bioensayo. Conn concluyó que esta actividad excesiva, sería debida a una hipersecreción de la hormona recientemente descubierta, Aldosterona, lo cual le llevó a la exploración quirúrgica de las suprarrenales, encontrando un adenoma unilateral y una vez extirpado éste, se produjo la mejoría del enfermo. En su descripción original en 1955 (9) llamó a este síndrome hiperaldosteronismo primario, para distinguirlo de diversas condiciones edematosas, en que el hiperaldosteronismo era secundario a desórdenes del riñón, hígado o circulación y causantes de manera secundaria del aumento de secreción de Aldosterona. Realmente, los estudios que llevaron a Conn a relacionar la hipersecreción de Aldosterona con el síndrome clínico que describió, fueron realizados muy anteriormente, en 1943, cuando realizaba estudios sobre la capacidad de aclimatación al calor y encontró que uno de los elementos más

importantes en la aclimatación al calor era la habilidad para reducir la cantidad de sodio en la secreción sudoral. Entonces sospechó que sería algún factor suprarrenal el responsable.

Como entonces la única hormona conocida como reguladora de sodio y potasio era la Desoxicorticosterona, realizó estudios con esta hormona, inyectándola a sujetos no aclimatados al calor, viendo que el contenido de sodio en su secreción sudoral disminuía en dos o tres días a los niveles de sujetos aclimatados (10).

Desde entonces, los conocimientos del metabolismo y fisiopatología de la Aldosterona, han progresado enormemente. A continuación revisaremos brevemente la situación actual de la Aldosterona y otros mineralocorticoides en la patología clínica actual, y en otros apartados de la introducción y como justificación de los estudios realizados, nos referiremos específicamente a la determinaciones de Aldosterona en fluidos corporales, a los métodos diagnósticos de hiperaldosteronismos y a los mecanismos de regulación de la secreción de Aldosterona.

En su descripción original del síndrome que lleva su nombre, Conn indicó que estaría compuesto por hipertensión, alcalosis hipokaliémica y pérdida urinaria del potasio en asociación con un aumento de secreción de Aldosterona, de la cual sería responsable un adenoma suprarrenal.

Posteriormente, Conn (11-12), sugirió que el hallazgo de actividad de Renina plasmática suprimida, añadido a los criterios previos, mejoraría la previsión diagnóstica. En sucesivos estudios de enfermos que presentaban el síndrome clínico de hiperaldosteronismo primario, se vió que

había enfermos que en vez de presentar uno o varios (13) adenomas, presentaban hiperplasia nodular bilateral de la zona glomerulosa de ambas suprarrenales (14-15-16-17-18-19), siendo la anatomía patológica difícil de definir entre casos de hiperplasia y adenoma, siendo a veces de estructura normal (13-18-20-21-22).

Después de la extirpación subtotal de las suprarrenales en estos casos de hiperplasia suprarrenal, se vió que existían casos en que no había mejoría de la hipertensión, creyéndose entonces que habría un hiperaldosteronismo superimpuesto a una hipertensión esencial, en particular en casos avanzados de hipertensión maligna (23-24). Se ha sugerido que estos casos de hiperplasia nodular bilateral, serían secundarios a otro factor desconocido (16-25), y deberían ser denominados pseudohiperaldosteronismo primario, aunque nosotros creemos que hasta que no se descubra el posible factor estimulador, deben quedar incluidos como hiperaldosteronismos primarios, o sea, situaciones clínicas en que existe una hiperproducción de Aldosterona y actividad plasmática de Renina suprimida.

Conn en un principio sugirió que estos casos de hiperplasia bilateral, serían hiperaldosteronismos primarios "congénitos", al notar que la mayoría de estos enfermos eran menores de 25 años (26), aunque ésto ha sido negado posteriormente, viéndose que hiperplasia suprarrenal bilateral es una causa común de hiperaldosteronismo primario y que éste puede aparecer en cualquier edad (17), aunque los casos descritos por Conn, Moran y Holten, con hipertensión maligna, quizás tengan una entidad propia (27-28).

Posteriormente, se han descrito casos de carcinoma suprarrenal, productor de Aldosterona, los cuales quedarían por

tanto incluidos dentro del síndrome de Conn o hiperproducción primaria de Aldosterona (29-30).

Hay grupos de enfermos con presentación atípica del síndrome de Conn, lo que en un principio ha llevado a la confusión de clasificarlos como entidades distintas. Un caso sería el llamado por Conn hiperaldosteronismo primario normokaliémico (31), que no sería más que en unos casos un estado inicial del proceso y en otras situaciones de depleción sódica en que no habría suficiente intercambio en túbulo distal con potasio.

Midiendo en estos enfermos, a partir de su isotopo estable, el contenido corporal total de potasio estaría disminuido (32). Los casos de hiperaldosteronismo primario con renina suprimida e hipertensión, pueden presentar a veces niveles normales de Aldosterona unido a una marcada depleción de potasio, reestableciéndose la secreción elevada una vez se corrige la pérdida de potasio (33).

Un nuevo capítulo en la descripción de los hiperaldosteronismos primarios ha sido abierto con la descripción de Sutherland en 1966 (34) de dos enfermos, padre e hijo, con un síndrome característico de hiperaldosteronismo primario con hipertensión benigna, déficit de potasio, secreción de Aldosterona aumentada y actividad plasmática de renina suprimida, encontrando además elevaciones intermitentes de 17 hidroxicorticoides y 17-cetosteroides en orina, con valores normales de ACTH y corticosterona, y elevación de pregnandiól en orina. En la exploración quirúrgica, se encontró hiperplasia nodular cortical, sin mejoría clínica tras la extirpación de una suprarrenal.

Los enfermos fueron sometidos a tratamiento con Dexametasona, siendo normalizados todos los parámetros con este tratamiento.

Posteriormente a esta descripción de hiperaldosteronismo primario glucocorticoide dependiente, New y Peterson (35) describieron un caso semejante con 17 hidrocorticosteroides disminuidos y en que el aumento de secreción de Aldosterona, hipertensión benigna y renina suprimida, fueron también normalizados con glucocorticoides.

Miura y col. (36), han descrito otro caso semejante, también con respuesta favorable al tratamiento con glucocorticoides, con la peculiaridad de encontrar en este caso, además de aumento de Aldosterona, una elevación de DOCA y Corticosterona. Bartter ha descrito también hipersecreción de Aldosterona en casos de déficit parcial de 21-hidroxilasa (37).

Las situaciones clínicas de aumento de Aldosterona de forma secundaria, serían en su mayoría debidas a un aumento de estímulo del sistema renina-angiotensina, que estimularía directamente la producción de Aldosterona en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal (38-39).

Las situaciones clínicas que llevan a un aumento de actividad del sistema renina-angiotensina, serían en primer lugar las que conducen a una disminución de presión en los baroreceptores del aparato yuxtglomerular (40-41).

Situaciones clínicas que tengan como consecuencia una depleción sódica, llevarían a la estimulación del sistema renina-angiotensina y por tanto a una hipersecreción de Aldosterona (42-43-44), aunque el estímulo de hiperproducción de renina en casos de depleción sódica, puede de-

berse en parte a un descenso de sodio en la macula densa (45-46). Un caso particular, serían los procesos en que hay formación de edema, como en el síndrome nefrótico, cirrosis hepática o insuficiencia cardíaca congestiva. En estos casos, aunque habría un aumento de sodio corporal total con acumulación de edema o ascitis, el mecanismo de retroalimentación negativo fallaría al haber desplazamiento fuera de la circulación del sodio y agua supletorios, produciéndose así un aumento de secreción de renina (47-48-49).

En casos de cirrosis (50-51) e insuficiencia cardíaca congestiva (50-51-52-53-54), contribuiría también a la hiperaldosteronemia la disminución del catabolismo de la hormona. En estas situaciones hay flujo sanguíneo hepático disminuido y existe evidencia de que la velocidad de catabolismo de Aldosterona estaría en función del flujo hepático (53-55-56). En estos casos con edema, no habrá normalmente aumento de presión arterial, a pesar de los elevados niveles angiotensina y aldosterona, lo cual parece ser que se debe a una menor sensibilidad al efecto presor de la angiotensina (49-57-58).

Un tipo de hiperaldosteronismo secundario sería el síndrome denominado "edema idiopático" o edema periódico" (59-60), en el que el proceso fisiopatológico básico sería una respuesta inapropiada a la posición erecta como factor precipitante (61) y quizás un aumento de permeabilidad capilar con pérdida de proteínas al espacio extravascular, sería el proceso fundamental (62-63).

Como respuesta a la obstrucción al flujo sanguíneo renal, puede observarse de manera secundaria, un estado de

hiperaldosteronismo en casos de hipertensión en su forma maligna o acelerada (64-65), con un nivel persistentemente elevado de angiotensina II en plasma periférico (66).

En el caso de hipertensión vasculo-renal con obstrucción de la arteria renal (67), hay mayor variación en la incidencia de hiperaldosteronismo secundario (68), con discrepancias entre los niveles a veces moderados de renina (69) o angiotensina II (70-71) y el grado de hipertensión, quizás indicando dos fases en el proceso de hipertensión vasculorenal con un segundo período, en que la hipertensión se hace independiente del mecanismo Renina-Angiotensina-Aldosterona (72).

Un caso particular en que habría hiperaldosteronismo e hipertensión por el mismo mecanismo, sería en el caso de tumores adyacentes a arterias renales, en que habría alteraciones de flujo renal (73).

Otro mecanismo fisiopatológico distinto, cuyo resultado final es un aumento de la actividad del mecanismo Renina-Angiotensina y por tanto, un aumento de la secreción de Aldosterona de forma secundaria, sería el recientemente descrito en pacientes tratadas con estrógenos a partir de la observación de la aparición de hipertensión durante el tratamiento con anticonceptivos orales (74-75-76), en algunos casos en forma maligna (77).

En estos casos, hay correlación directa entre la aparición de hipertensión y niveles elevados de Renina, Angiotensina II y Aldosterona (78). Este aumento de actividad sería debido a un aumento del substrato de angiotensina, (angiotensinógeno) (74-79-80), lo cual conduce a un aumento

de producción de Angiotensina y estimulación de la secreción de Aldosterona, aún en el caso de niveles disminuidos de Renina.

Otra situación clínica descrita en la que hay un exceso de secreción de Aldosterona con hipertensión, debido a un exceso de Angiotensina, serían los casos de tumores renales productores de renina (81-82), o tumores extrarenales productores de sustancias con efecto parecido a Renina (83

En el síndrome descrito por Bartter (84), existe también un aumento de Aldosterona secundario al estímulo del sistema Renina Angiotensina, en el que existe una falta de respuesta al efecto presor de Angiotensina con un hiperaldosteronismo que hasta ahora se creía responsable de la alcalosis hipokaliémica del síndrome, aunque los casos familiares descritos por Trygstad (85) en que no hubo cambio electrolítico con adrenalectomía bilateral y los estudios de Bocksoor (86) y Goodman (87), parecen indicar un defecto primario en el túbulo renal para la reabsorción de sodio y potasio (88) en el llamado síndrome de Bartter.

Hiperaldosteronismo secundario a otros estímulos diferentes al del sistema Renina-Angiotensina, ocurre en situaciones de aumento de potasio plasmático como en casos de ingestión excesiva de potasio (4), aunque las alteraciones en el metabolismo del potasio per se tienen poco significado en la fisiopatología de los hiperaldosteronismos (47).

El hiperaldosteronismo transitorio observado en algunos casos durante los ataques de parálisis periódica familiar (89), quizás es debido al estímulo directo sobre las células de la zona glomerulosa, producido por un aumento intracelular de potasio, aunque también el exceso de Aldosterona

puede ser responsable en parte del desencadenamiento del ataque.

En procesos que originan una pérdida renal de potasio, puede existir una secreción elevada de Aldosterona, principalmente a causa del déficit en la reabsorción sódica.

El hiperaldosteronismo observado en el embarazo normal, sería secundario a la elevación de los niveles de renina que comienza en el primer trimestre, disminuyendo rápidamente a niveles normales en el período post-parto (90). El mecanismo exacto de esta elevación no ha sido aún dilucidado, aunque se cree que es una adaptación fisiológica a la nueva situación hemodinámica.

Por otra parte, el aumento del sustrato de renina inducido por estrógenos, sería uno de los factores implicados. La respuesta a la angiotensina estaría disminuida en el embarazo, al igual que en otras situaciones de hiperaldosteronismo secundario. Chesley ha logrado reproducir esta situación refractaria administrando Progesterona a mujeres no embarazadas, en dosis comparables a las existentes en los últimos períodos del embarazo (91).

Por último, citaremos un mecanismo de hiperaldosteronismo secundario a un aumento de actividad del sistema Renina-Angiotensina, descrito en pacientes afectados de tuberculosis crónica por A.M. Holmes (92). Estos enfermos presentan evidencia de hiperaldosteronismo con elevados niveles plasmáticos de Renina y Aldosterona, y alcalosis hipokaliémica e hipomagnesiémica. La aparición de hiperaldosteronismo en estos enfermos parece estar relacionada con el tratamiento utilizado de Gentamicina y Etambutol, a diferencia de otros casos de hipermineralocorticismo descritos anteriormente en

enfermos con tuberculosis crónica, en los que realmente existiría un pseudoaldosteronismo, debido al uso de extractos de licorice, como vehículo del ácido para-aminosalicílico utilizado en el tratamiento de estos enfermos (93-94).

Existen también situaciones clínicas de aumento de Aldosterona secundariamente a un exceso de ACTH.

En el síndrome de Cushing es raro encontrar una secreción aumentada de Aldosterona (95) y parece ser que la marcada alcalosis hipokaliémica e hipertensión descrita en ciertos casos sería debido a la acción de niveles elevados de cortisol y del mineralocorticoide 18-OH-DOCA (96), como parece suceder en los casos de síndrome de Cushing debidos a la producción ectópica de ACTH por neoplasias extraadrenales (97). En el síndrome de Cushing, la secreción de Aldosterona sería normal en la mayoría de los casos, quizás por el efecto inhibitorio que sobre esta secreción tiene la hipervolemia (98). Las situaciones transitorias de hiperaldosteronismo observadas en períodos postoperatorios serían en parte debidas a un aumento de ACTH como respuesta al stress quirúrgico.

Vamos ahora a citar brevemente los síndromes clínicos descritos con el hallazgo común de una secreción de Aldosterona disminuida. Primero mencionaremos síndromes en los que existe un hipoaldosteronismo primario, y luego describiremos las situaciones de hipoaldosteronismo secundarias a un aumento de otros mineralocorticoides, con supresión de la secreción de Aldosterona.

Aparte de los síndromes de insuficiencia adrenal global, en que hay una deficiencia de Aldosterona (4), también existe

un síndrome de hipoaldosteronismo, sin la asociación de déficit glucocorticoideo. Este síndrome ha sido descrito tanto en adultos (99-100) como en niños (100-102), y se acompaña de deshidratación hiperkaliemia e hiponatremia.

El déficit de Aldosterona sería debido a un defecto en la hidroxilación C-18 (105) o a un déficit de la 18-dehidrogenasa (106).

Un síndrome de hipoaldosteronismo secundario, a un nivel disminuido de actividad plasmática de renina, ha sido descrito recientemente por McAllister (103) y por Sanstead (104), en enfermos con intoxicación crónica por plomo.

En estos casos, habría una inhibición directa a la producción de Renina, a causa de depósitos de plomo en el riñón, y sería un proceso reversible con tratamiento quelante.

Recientemente, A. Christlieb y G. Williams (107-108) han descrito un síndrome en pacientes diagnosticados de hipertensión esencial en los que existiría un hipoaldosteronismo, por una defectuosa estimulación de niveles adecuados de Angiotensina II sobre la zona glomerulosa suprarrenal.

En casos de pérdida renal primaria de potasio, existiría una inhibición directa sobre la zona glomerulosa, con el consiguiente hipoaldosteronismo (109), aunque en otros casos el déficit de reabsorción de sodio, produciría un aumento en la secreción de Aldosterona.

Otros defectos enzimáticos en la síntesis de esteroides y que producen un descenso de la producción de Aldosterona serían el de 3- β -dehidrogenasa (110), en el que hay pérdida de sal severa y un alto índice de mortalidad.

El defecto más común es el déficit de 21-hidroxilasa (110), en que en un 50% de los casos existiría cierto grado de pérdida de sal, con un déficit relativo de Aldosterona y una producción aumentada de 17- α -hidroxiprogesterona, que funcionaría como antagonista de la Aldosterona a nivel tubular renal.

Los déficits de 11- β -hidroxilasa y 17- α -hidroxilasa, quedarían incluidos en el grupo de hipertensión por otros mineralocorticoides distintos que Aldosterona, con secreción de Aldosterona suprimida por estos.

En el déficit de 11- β -hidroxilasa, existe una variedad hipertensiva por producción elevada de deoxicorticosterona, la cual al inhibir el sistema Renina-Angiotensina, produce un hipoaldosteronismo (111).

En el síndrome de Biglieri o déficit total de 17- α -hidroxilasa, existe una producción aumentada de corticosterona y DOCA (112), siendo la hipertensión debida a los niveles excesivos de estos mineralocorticoides, lo cual produciría supresión de Renina con la consecuencia de hipoaldosteronismo (113).

Liddle ha descrito un síndrome en dos hermanos, consistente en hipertensión con alcalosis hipokaliémica e hiperkaliuria, con Aldosteronuria disminuida y no respuesta a la Espinorolactona, pudiendo ser controlada la pérdida de potasio con antagonistas no específicos como Triamtereno. El síndrome podría explicarse como una hipersensibilidad del túbulo renal a la acción de la Aldosterona (114).

Por último, mencionaremos brevemente el apartado de hipertensión por otros mineralocorticoides aparte de la

Aldosterona, mencionando los últimos avances en este campo para así subrayar la importancia que los trabajos sobre hipertensión mineralocorticoidea están adquiriendo en el estudio de la hasta ahora llamada hipertensión esencial.

Ya hemos mencionado las hipertensiones producidas por DOCA y Corticosterona en las hiperplasias suprarrenales por bloqueo de la 11-hidroxilasa y la 17-hidroxilasa. También la hipertensión posiblemente causada por 18-OH-DOCA en los síndromes de Cushing, causados por ACTH ectópico. Existen también otros cuadros clínicos que cursan con hipertensión causada por otros mineralocorticoides distintos que la Aldosterona, con secreción de Aldosterona disminuida a causa de la supresión del sistema Renina-Angiotensina.

Entre estos estarían los casos descritos de tumores suprarrenales, productores de DOCA (115-116) o de Corticosterona (117-118).

También estaría incluido en este apartado el síndrome producido por ingestión de extractos de Licorice, descrito por Revers (119) y por Malhuysen (120), debido al efecto similar a los mineralocorticoides del ácido glicirrínico contenido en el extracto de Licorice (121).

Un nuevo aspecto enormemente interesante en el estudio de las hipertensiones inducidas por mineralocorticoides, ha sido el introducido por las recientes observaciones de que una proporción significativa de quizás un 20% de la población hipertensiva, presenta una actividad de Renina plasmática suprimida (122-123-124-125), con hiposecreción de Aldosterona.

La posibilidad de que esta supresión sea debida a una secreción excesiva de un mineralocorticoide, ha sido confirmada por Woods (126), al inhibir la esteroidogénesis en nueve de estos enfermos con aminoglutetamida, disminuyendo así la hipertensión y normalizando la respuesta fisiológica de Renina plasmática.

Este posible aumento de un mineralocorticoide desconocido, como responsable de la supresión de Renina plasmática, ha sido confirmado por E. Adlin y col. (127), midiendo la relación Na/K en este grupo de hipertensos esenciales, con secreción de Aldosterona normal o disminuida y comprobando que esta relación es similar a la de enfermos con exceso mineralocorticoideo. J. Gunnells (128) ha publicado una serie de enfermos hipertensos esenciales, con actividad de Renina plasmática suprimida y en siete de ellos encontró una excreción de Aldosterona disminuida, encontrándose en los siete un adenoma suprarrenal en la exploración quirúrgica, y tras su extirpación hubo mejoría de la hipertensión en todos ellos.

Russell, en un estudio retrospectivo de 35.000 autopsias publicado recientemente (129), ha encontrado una incidencia de 0,51% de hiperplasia suprarrenal, con un aumento de incidencia de hipertensión esencial significativa en este grupo.

Por último, Melby y col. (96), estudiando enfermos hipertensos esenciales por medio de cateterización de vena suprarrenal, encontró en cuatro de ellos una secreción elevada del mineralocorticoide 18-OH-DOCA, recientemente identificado en humanos (97), con baja secreción de DOCA y Aldosterona.

Este mineralocorticoide es producido en la zona fasciculada y es ACTH dependiente. Uno de los enfermos descritos por Melby fue tratado con Dexametasona, con normalización de niveles de Renina, tensión arterial y descenso de la secreción de 18-OH-DOCA.

Con la descripción de estas observaciones, hemos querido resaltar la importancia del estudio de la secreción de mineralocorticoides y su relación con hipertensión, pues por un lado la incidencia de hiperaldosteronismo primario entre la población hipertensiva, varía entre 0,5 y 7,5%, dependiendo de la capacidad confirmatoria de los distintos laboratorios (32-130-131-132) y por otra parte, si el 20% de hipertensos esenciales que hemos comentado, tienen como mecanismo hipertensivo primario un exceso de mineralocorticoide, el número de hipertensiones endocrinas susceptibles de curación sería muy significativo.

Por último, mencionaremos el hasta ahora hipotético cuadro clínico de hiperaldosteronismo terciario, que sería una entidad clínica independiente, en la cual un estímulo de secreción de Aldosterona de forma secundaria, produciría en ciertos casos una transformación adenomatosa de la zona glomerulosa suprarrenal, produciéndose entonces de manera autónoma una hipersecreción de Aldosterona (133).

Con esta revisión general de las principales situaciones clínicas, en que existen alteraciones de la secreción de Aldosterona, hemos querido subrayar la importancia que hoy tiene el estudio adecuado de la secreción de Aldosterona en el mecanismo fisiopatológico de diversos cuadros clínicos. En la Tabla adjunta, hemos hecho una sinopsis

de las distintas situaciones de hiper o hipoaldosteronismo, como resumen de esta primera parte de la introducción.

Todos estos procesos quedarían incluidos dentro del grupo de discorticalismos según la acepción dada a este término por A. Fernandez-Cruz (162-BIS).

En los próximos apartados de la introducción, revisaremos en concreto la situación actual de las mediciones de Aldosterona en clínica, los métodos diagnósticos actuales de hiperaldosteronismos y los conocimientos actuales sobre los mecanismos de regulación de Aldosterona.

HIPERALDOSTERONISMOSHIPERALDOSTERONISMO PRIMARIO

	Adenoma
No suprimible	Carcinoma
con	Hiperplasia nodular
glucocorticoides	Hiperaldosteronismo congénito
	Sutherland
Suprimible	New
con	Miura
glucocorticoides	Bartter (bloqueo incompleto 210H)

HIPERALDOSTERONISMO SECUNDARIOExceso AngiotensinaA- Presión disminuida baroreceptores

1- Disminución tensión arterial efectiva

a- Depleción de volumen

Dieta pobre en sodio

Diureticos

Hemorragia

Pérdida salina (renal, digestiva)

b- Estados edematosos

Cirrosis

Síndrome nefrótico

Insuficiencia cardiaca congestiva

Edema idiopático

2- Obstrucción flujo renal

a- Hipertensión renovascular

b- Hipertensión acelerada

c- Tumores adyacentes a vasos renales

B- Descenso nivel de sodio en macula densa

C- Aumento substrato renina

Terapia estrogénica, Embarazo

- D- Tumores renales productores de renina
- E- Tumores extrarrenales con producción ectopica de renina
- F- Tratamiento tuberculosis (Gentamicina, Etambutol)
- G- Síndrome de Bartter

Exceso K

Exceso ACTH

HIPERALDOSTERONISMO TERCARIO

HIPOALDOSTERONISMOS1- Bloqueos síntesis con déficit aislado de Aldosterona

Déficit C-18 hidroxilasa

Déficit 18 dehidrogenasa

2- Bloqueos con déficits combinadosDéficit 3 β dehidrogenasa

Déficit 21 hidroxilasa (50% déficit relativo)

3- Inhibición del sistema renina-angiotensina por otros mineralocorticoides

Tumores productores de DOCA o Corticosterona

Déficit 11 β hidroxilasa, (DOCA)Déficit 17 α hidroxilasa, (DOCA, Corticosterona)

Cushing por ACTH ectópico, (18-OH-DOCA), (Aldo N o)

Hipertensión "esencial" con renina suprimida, (Derivado de 18-OH-DOCA ?)

Licorice

4- Hipoproducción de renina

Plumbismo

5- Síndrome de Liddle6- Déficit estímulo angiotensina (Cristlieb-Williams)

2 - INTRODUCCION A LOS METODOS DE CUANTIFICACION DE ALDOSTERONA.

El esteroide Aldosterona, en contraste con otros esteroide naturales, no circula en plasma unido a una proteina especifica sino que sólo mantiene una laxa unión con albumina.

Por otra parte, la tasa de aclaramiento metabólico es muy elevada, de unos 1600 litros día (53). Estos dos cualidades de falta de unión especifica y elevado aclaramiento hacen que la concentración en plasma periférico sea extremadamente baja, lo cual ha conducido a que los métodos para determinar aldosterona en el hombre hayan estado confinados hasta muy recientemente a la determinación de metabolitos en orina.

La Aldosterona presente en sangre y orina es segregada en su totalidad por las glándulas suprarrenales sin que exista ninguna evidencia de interconversión con otras hormonas. Los metabolitos excretados en orina son principalmente el derivado formado por reducción del anillo A o tetrahydroaldosterona glucuronido que representa un 30% de la aldosteron segregada. El otro sería la forma pH-1 labil que es un derivado aldosterona-18-glucuronido que se hidroliza a pH ácido, dando Aldosterona libre y que representa un 10 - 15% de la tasa de secreción. El derivado tetrahydro sería sintetizado en el hígado y el derivado pH labil en el riñon (134).

Los métodos urinarios se han basado principalmente en la determinación del metabolito pH labil al ser éste convertido facilmente a Aldosterona libre.

Las cantidades presentes en orina de 24 horas son de unos 7 a 15 μ g en dieta normal.

Todas las técnicas urinarias están basadas en múltiples separaciones cromatográficas de Aldosterona libre una vez realizada la hidrólisis correspondiente. La cuantificación final puede basarse en reacciones de color o fluorescencia como el método de Hernando (135) que utiliza azul de tetrazolium, el de Mattox (136), mediante oxidación y posterior reacción de Porter-Silber, el de Staul (137) con Butóxido-potasio ternario o el de Tait (138) que se basa en fluorescencia de soda.

De todos estos métodos el mejor según Morton (139) sería el de Tait, utilizando un fluorómetro Turner adaptado para análisis de fluorescencia del papel cromatográfico.

Un gran avance en los métodos urinarios supuso la introducción de las técnicas doble isotópicas, siendo el método de Kliman (140) el más utilizado. Con estos métodos se logró una mayor precisión aunque claro es, a costa de una mayor dificultad técnica pues los diferentes métodos están basados en unas cuatro cromatografías en papel aparte de las dificultades inherentes a la purificación de los reactivos marcados.

Son evidentes las limitaciones que presentan estos métodos urinarios, por una parte debido a los problemas inherentes a toda colección de orina en 24 horas, especialmente en la medición del metabolito pH labil que sólo representa un 10 - 15% del total de secreción con lo que un mínimo error en la colección de orina produce resultados equivocados con suma facilidad.

Por otra parte, en casos de alteración de la función hepática o renal, la excreción de los derivados tetrahidro o pH labil no reflejaran adecuadamente la tasa de secreción.

La determinación de la tasa de secreción es más adecuada y refleja más exactamente los cambios en la producción de Aldosterona. En general están basados en el cálculo de la tasa de secreción a partir de la actividad específica del derivado tetrahydroaldosterona en orina de 24 horas después de la inyección de Aldosterona marcada (141).

Estos métodos plantean el inconveniente de la necesidad de administración de un isótopo, necesitándose varios procesos cromatográficos para el aislamiento del derivado tetrahydro en orina.

Otro factor a tener en cuenta en todos estos métodos urinarios de excreción como de tasa de secreción es el mecanismo de feedback, pues los niveles de Aldosterona no alteran directamente en cambios agudos los mecanismos de secreción, habiendo por lo tanto situaciones en que se puede alterar el aclaramiento originando cambios en la concentración plasmática sin una alteración en la excreción urinaria o en la tasa de secreción (139).

De lo anteriormente indicado, se deduce la necesidad de métodos analíticos suficientemente sensibles como para determinar la concentración de Aldosterona en plasma periférico.

Los intentos de utilizar la cromatografía en fase gaseosa para esta determinación no han sido satisfactorios debido a la inestabilidad de la Aldosterona.

El desarrollo del detector de captura de electrones (142) ha hecho posible la determinación de concentraciones mínimas de sustancias capaces de interaccionar con electrones térmicos. La capacidad de captura de los esteroides naturales puede ser aumentada mediante la formación de derivados

como haloacetatos (143) y perfluorobutiratos (144-145).

Los intentos de medición de Aldosterona por esta técnica han dado como resultado métodos que aunque permiten la determinación de Aldosterona, no son lo suficientemente sensibles como para determinar las mínimas concentraciones existentes en plasma periférico. (146-147).

Algunos de ellos como el de Palem (148), pueden ser utilizados en determinaciones en soluciones con concentración elevada de Aldosterona, como en el caso de análisis de medio de incubación de glándulas suprarrenales, aunque los métodos colorimétricos son más sencillos y útiles en estas concentraciones. Nicolis (144), utilizando cromatografía de gases con detector de captura de electrones, ha descrito un método mediante el cual es capaz de determinar concentraciones de hasta 3 ng/100 ml. utilizando 40 mg. de plasma.

El método es tan complicado de ejecución, como los métodos doble isotópicos de que hablaremos a continuación, siendo menos sensible y específico que estos, por lo cual hasta ahora los únicos métodos utilizados en la determinación plasmática de Aldosterona han sido los doble isotópicos, los cuales debido a su extremada complejidad han estado reservados a laboratorios de investigación con el espacio y preparación técnica necesarios.

La teoría general de las técnicas doble isotópicas fue establecida por Avivi y colaboradores in 1954 (149), siendo aplicada al campo de los esteroides por Kliman (140).

Un método indirecto doble isotópico para la determinación de concentración de Aldosterona en plasma periférico es el desarrollado por Tait y Tait a partir de la determinación de la tasa de secreción y tasa de aclaramiento metabólico (150)

mediante infusión continua de H^3 -Aldosterona.

Los métodos directos doble isotópicos están basados en el uso de esteroide marcado como indicador general de pérdidas del procedimiento y la formación de un derivado por medio de un reactivo específico marcado con otro isótopo distinto, purificación de dicho derivado mediante múltiples sistemas cromatográficos y determinación final de la actividad específica de dicho derivado a partir de la cual se calcula la concentración inicial.

En general los métodos hasta ahora descritos utilizan anhídrido acético marcado como reactivo. En el método de Peterson (151) se utiliza C^{14} -anhídrido acético como reactivo marcado y H^3 -Aldosterona como indicador de pérdidas. Debido al coste elevado del reactivo C^{14} se han intentado modificaciones como la de Bojesen (152) que utiliza como reactivo Tolueno anhídrido sulfónico marcado con S^{35} como reactivo y H^3 -Aldosterona como indicador. Hasta ahora los métodos más utilizados por su mayor especificidad son los introducidos por Brodie (153) y Coghlan (154), en los que el reactivo consiste en H^3 -anhídrido acético y el indicador de pérdidas C^{14} -Aldosterona, lo cual ha sido posible gracias a la disponibilidad de C^{14} -Aldosterona con gran actividad específica permitiendo el uso de una masa mínima como indicador.

Por otra parte se ha conseguido H^3 -anhídrido acético de muy elevada actividad y gracias a la destilación en vacío del reactivo se han logrado disminuir los valores de blanco no específico. Estos métodos doble isotópicos mediante las modificaciones comentadas han logrado gran sensibilidad y precisión aunque su gran dificultad técnica impiden su

aplicación practica.

El método descrito recientemente por Bayard es uno de los más simplificados técnicamente aunque incluye ocho cromatografías en papel aparte de la extracción, formación de derivado acetilado y lactonización con un porcentaje final de Aldosterona recobrada de un 32% de la cantidad original. En esta breve revisión de los métodos de determinación de Aldosterona hemos querido indicar la necesidad de un método sencillo y preciso para determinar concentraciones plasmáticas de Aldosterona tan necesario para el estudio de la fisiopatología de esta hormona. La introducción del método de radioinmunoensayo, análisis de saturación o competición de unión protéica por Yalow y Berson (155), supuso una nueva orientación en la metodología analítica endocrinológica. Esta técnica analítica fue utilizada en un principio en la determinación de hormonas protéicas y estaba basada en la obtención de anticuerpos específicos contra la hormona protéica a estudiar, analizando el desplazamiento producido en la unión anticuerpo específico - hormona marcada por diferentes concentraciones de hormona inerte.

La aplicación de esta técnica a la medición de esteroides quedaba limitada por la imposibilidad de obtener anticuerpos específicos al no ser antigénicas las moléculas esteroideas. Un nuevo avance supusieron los estudios de Murphy sobre la utilización de la propiedad que ciertas proteínas naturales tienen de unir determinados hormonas de manera específica (156-157), utilizando de esta manera proteínas naturales como ligando en vez de anticuerpos en el análisis competitivo. De esta manera se han logrado desarrollar métodos de determinación de diferentes esteroides utilizando distintas proteínas naturales y distintos métodos de separación (157)

ya que, para esteroides como cortisol, testosterona, progesterona e incluso estradiol, existen de manera natural proteínas estables con afinidad más o menos específica que pueden ser utilizadas como ligandos.

La hormona Aldosterona no circula unida a ninguna proteína plasmática específica existiendo sólo una unión laxa con albúmina. Por otra parte el receptor renal para esta hormona no es suficientemente estable como para ser utilizado como ligando (158).

Una nueva orientación en la posible aplicación de las técnicas de radioinmunoensayo a la medición de concentraciones de esteroides naturales, supuso la obtención por Lieberman (159) de anticuerpos específicos de esteroides utilizando como antígeno conjugados de proteína con esteroide con capacidad antigénica.

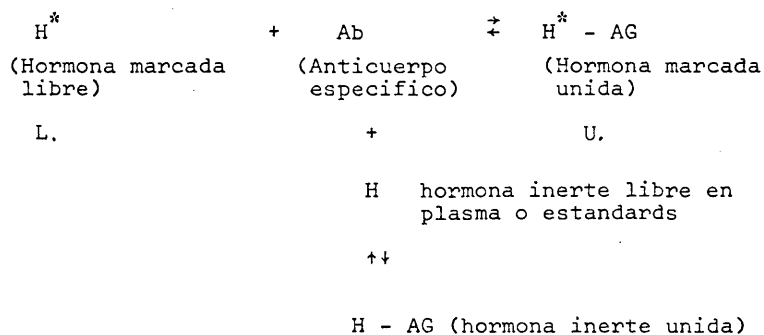
La posibilidad de formar anticuerpos específicos Antialdosterona y utilizarlos como ligando en el desarrollo de un método de radioinmunoensayo fue prevista recientemente por Horton (139) como la única solución práctica para la determinación de Aldosterona plasmática.

El propósito del presente trabajo ha sido el expuesto anteriormente, o sea el desarrollo de una técnica de radioinmunoensayo utilizando como ligando anticuerpos específicos antialdosterona para la determinación de concentraciones de Aldosterona plasmática pues consideramos que las técnicas de desplazamiento a causa de su gran sensibilidad y sencillez serían la solución práctica a las múltiples determinaciones necesarias en cualquier estudio de la fisiopatología de la Aldosterona, permitiendo la generalización de estas determinaciones hasta ahora limitadas por las óbvias dificultades

de los métodos doble isotópicos hasta ahora en uso. Una vez desarrollado el método, hemos querido realizar como aplicación práctica del mismo, diversos estudios clínicos que especificamos en las introducciones a los mecanismos de regulación de aldosterona y a los métodos diagnósticos de hiperaldosteronismos. Los anticuerpos utilizados en el desarrollo del método fueron obtenidos en la Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewbury, Mass., U.S.A., mediante inyección en cordero de un conjugado de albumina con D-Aldosterona 18-21 dihemisuccinato.

Los principios generales de las técnicas de radioinmunoensayo han sido establecidos por Yallow y Berson (160-161-162) y por Felbes (163) en diversas publicaciones.

El principio de todo radioinmunoensayo puede sumarse en las siguientes reacciones competitivas:



La hormona marcada se une al anticuerpo o ligando específico formando un complejo antígeno-anticuerpo marcado estando basado el radioinmunoensayo en la capacidad de la hormona inerte en plasma o cualquier otra solución de competir con la hormona marcada por los puntos de unión del ligando, inhibiendo por tanto la unión de la hormona marcada. Como resultado, la relación de las fracciones libre e unida (L/U)

de la hormona marcada disminuirá en relación inversa a la concentración de hormona inerte, pudiéndose conocer la concentración de hormona inerte en un espécimen comparando la inhibición observada en el sistema con la producida por disoluciones estandard conteniendo cantidades conocidas de hormona. Esta comparación se realizaría determinando la cuantía de las fracciones L o U de la hormona marcada mediante separación y cuantificación por determinación de su radioactividad.

Al intentar el desarrollo de un radioinmunoensayo para la determinación de Aldosterona, nos hemos planteado los problemas generales existentes en estos métodos. Uno de ellos es el de identidad entre las hormonas marcadas e inerte. Nosotros hemos utilizado 1-2 H³-Aldosterona o su derivado lactona como elemento marcado.

En el marcaje de esteroides, si se tiene la precaución de purificar las hormonas marcadas para la eliminación de radioactividad contaminante, no existe el problema presente en hormonas protéicas ya que la actividad biológica e inmunológica no se ve alterada en los esteroides por la introducción de tritio en la molécula.

La sensibilidad del ensayo viene dada por la especificidad del ligando y por la actividad específica de la hormona marcada. Con el uso de Aldosterona tritiada de elevada actividad específica, no existe esta limitación de sensibilidad. En cuanto a la especificidad del antisuero, aunque los obtenidos fueran de alto título y muy específicos, es claro que, aunque las reacciones cruzadas con otros esteroides naturales fuesen de orden muy pequeño, a causa de la gran diferencia de concentraciones entre Aldosterona y otros esteroides como cortisol,

la interferencia en el sistema sería muy elevada por lo que desde un principio nos planteamos la necesidad de una purificación previa de la Aldosterona en plasma, separándola de otros esteroides y sustancias que interfiriesen en el sistema de competición.

INTRODUCCION A LOS METODOS DIAGNOSTICOS DE HIPERALDOSTERONISMOS.

Desde la descripción de Conn de hiperaldosteronismo primario como causa de hipertensión, ha habido un esfuerzo continuado para desarrollar un método simple y eficaz mediante el cual puedan detectarse los casos de hipersecreción primaria de Aldosterona. Es evidente que este tipo de hipertensión en una enfermedad potencialmente curable y por tanto es necesario un diagnóstico preciso. A partir de la polémica iniciada por Conn sobre la verdadera incidencia de hiperaldosteronismo primario (131-164), diversos autores concuerdan en afirmar que la frecuencia de este proceso es más elevada que la hasta ahora indicada, quedando un significativo porcentaje de casos sin descubrir debido a su dificultad diagnóstica ya que, como veremos a continuación, los métodos diagnósticos corrientemente utilizados o carecen de especificidad o su extremada sofisticación impide el uso generalizado.

En las primeras descripciones del síndrome, el diagnóstico estaba basado en la asociación de hipertensión arterial y depleción de potasio con hipersecreción de aldosterona.

Posteriormente Conn añadió a los criterios diagnósticos la existencia de actividad plasmática de Renina suprimida y excreción normal de 17-hidroxycorticosteroides (12-165).

Habría que sospechar hiperaldosteronismo en enfermos hipertensos que presenten síntomas secundarios a un déficit de potasio como poliuria, nocturna, polidipsia, síntomas neuromusculares como debilidad, parestesias, tetania, parálisis intermitente. En un 50% de estos enfermos se han encontrado

curvas de tolerancia de glucosa anormales con insulinopenia debido a la depleción potasica (32-166).

Desde la descripción de Conn de casos de hiperaldosteronismo primario con potasio normal (31), el criterio de hipokaliemia no sería totalmente válido.

En general habría dos aproximaciones básicas al problema diagnóstico planteado por estos enfermos.

Una sería por distintos tests en los que habría que confirmar por medición directa la hiperproducción de Aldosterona y la hipoproducción de renina. A estos métodos nos referimos al final de esta introducción. La segunda aproximación sería el estudio del efecto mineralocorticoide que el exceso de Aldosterona ejerce en la regulación del sodio y potasio corporales, viendo este efecto con distintas manipulaciones, infiriendo que los distintos cambios de potasio en plasma y orina reflejan cambios en la secreción de Aldosterona. Estos serían los métodos diagnósticos más sencillos y por tanto el alcance de laboratorios generales aunque como veremos son más inexactos.

Recordaremos que en sujetos normales la respuesta a una dieta pobre en sodio es un aumento de la secreción de Aldosterona y una dieta elevada en sodio produce supresión de esta secreción (43-135-167), siendo mediada esta respuesta a través del sistema renina-angiotensina. En presencia de hiperaldosteronismo primario la secreción de aldosterona puede ser estimulada por diversos mecanismos (168-169-170), pero no suprimida. El efecto de aldosterona en el túbulo distal renal sería de intercambio de sodio y potasio, siendo este intercambio función del número de iones de sodio que llegan al túbulo distal.

En casos de producción elevada de Aldosterona de manera autónoma, una ingestión pobre en sodio produciría una excreción limitada de potasio ya que habría una cantidad disminuída de iones sodio en el túbulo distal para su intercambio. Por otra parte una dieta rica en sodio produciría en estos casos un aumento de las pérdidas de potasio en orina ya que la secreción de Aldosterona no sería suprimida y continuaría facilitando el intercambio de sodio.

La presencia de deficit de potasio debido a pérdida por la orina, puede ser demostrada mediante la maniobra introducida por Milne (171), administrando un exceso de potasio de 100 mEq/día en adición a la ingesta normal. En enfermos con hiperaldosteronismo existiría una retención de unos 300 mEq con un aumento en la concentración serica aunque se han descrito algunos casos refractarios a este repleción (171). Al suprimir el suplemento de potasio reaparece un balance negativo con pérdidas urunarias de potasio superiores a la ingesta durante algunos días hasta que los niveles plasmáticos descienden. Se puede obtener información adicional colocando el paciente en dieta pobre en sodio de unos 10 mEq/día en que la mayoría de los enfermos con hiperaldosteronismo primario conservan sodio normalmente. Como mencionabamos antes, en esta situación existiría una reducción en la pérdida urinaria de potasio al llegar menos iones Na intercambiabiles al túbulo distal renal (52-172) estableciéndose un balance positivo de potasio y elevándose el nivel plasmático (173).

Una maniobra muy importante en la determinación de hiperaldosteronismo es la sobrecarga oral de sodio que, al no producir inhibición de la secreción autónoma de Aldosterona, produciría

una mayor pérdida de potasio urinario. La ingestión de un exceso de sodio de 200 mEq/día durante cuatro días no produce cambios en el potasio plasmático de sujetos normales o hipertensos sin hiperaldosteronismo y en contraste en enfermos con hiperaldosteronismo, hay un descenso por debajo de 3.5 mEq/L (17-32). Esta maniobra sería también un test provocativo en hiperaldosteronismo normokaliémico, siendo la hipokaliemia inducida por sobrecarga sódica un índice de producción elevada de Aldosterona sin distinguir entre hiperaldosteronismo primario o secundario.

La rápida excreción de una sobrecarga de agua y sodio observada en hiperaldosteronismo estaría en relación con un aumento de filtración glomerular (174) y con la expansión del compartimento extracelular presente en estos enfermos (166). Este fenómeno no es de gran ayuda diagnóstica ya que estaría presente en otras causas de hipertensión.

El antagonista competitivo de la Aldosterona, Espironolactona, ha sido utilizado en una prueba diagnóstica introducida por Melby (175).

La inhibición de la actividad de Aldosterona sería lograda con una concentración molar entre 100:1 y 1000:1 de relación Espironolactona:Aldosterona. La administración de dosis elevadas (más de 400 mgr/día) durante cierto tiempo produciría en enfermos con hiperaldosteronismo primario, una significativa reducción en la presión arterial, siendo este efecto mucho menor o nulo en casos de hipertensión con hiperaldosteronismo secundario. En enfermos con hipertensión esencial con secreción normal de Aldosterona, pueden presentar una mejoría de la hipertensión con Espironolactona aunque se obtiene este efecto con dosis menores, del orden de 100 mgr/día.

Otra prueba diagnóstica sería el test de sobrecarga sódica-Espinorolactona introducido por Birchall y Batson (176) en el que se compara el aclaramiento de potasio antes y después de la administración de Espironolactona mientras el enfermo es mantenido en una dieta alta en sodio; una disminución del 50% o más del aclaramiento de potasio indicaría hipersecreción de Aldosterona aunque sin distinguir si es por mecanismo primario o secundario.

Desde las observaciones de Conn (177), indicando que en las glándulas sudoríparas no se produciría el mecanismo de escape observado en el riñón, se ha intentado aplicar el estudio del contenido electrolítico de la secreción sudorípara al diagnóstico de hiperaldosteronismo, diferenciándose la hipersecreción de Aldosterona mediante la determinación de Na/K (173-179).

Indice también de un exceso de acción mineralocorticoidea y por tanto método diagnóstico de hiperaldosteronismo, sería el contenido en sodio y potasio de la secreción salivar en que una relación Na/K menos de 0.25 sería diagnóstica de hiperaldosteronismo (178), aunque posteriormente no se ha confirmado su eficacia (173-180). Recientemente S. Wotman et al., midiendo concentraciones de potasio en secreción de glándula submaxilar, han encontrado distintas concentraciones en casos de hiperaldosteronismo primario debidos a adenoma que en casos de hiperplasia (181), lo cual no sería más que un resultado de distintos niveles de Aldosterona en los dos procesos.

Otros intentos diagnósticos de hiperaldosteronismo mediante el estudio de las alteraciones electrolíticas que el aumento de la secreción de Aldosterona ocasiona, han sido la determinación de potasio intracelular en hematies (182), la medida de la diferencia de potencial eléctrico en la mucosa rectal (183) y la determinación de electrolitos en heces (171-184),

estando todos ellos basados en el bajo cociente Na/K en diversos fluidos corporales como resultado de hipermineralocorticismo.

En general todos estos métodos diagnósticos descritos hasta ahora son imprecisos e inespecíficos ya que no distinguirían entre hiperaldosteronismo primario y otros hiperaldosteronismos con la precisión de los métodos diagnósticos en que se determina directamente la secreción de Aldosterona. Ya hemos descrito en la introducción al análisis de Aldosterona los métodos hasta ahora utilizados en el estudio directo de la secreción de Aldosterona como son la determinación directa en orina de sus metabolitos, la medición de su secreción por métodos isotópicos o la difícil determinación en plasma de niveles de Aldosterona por métodos indirectos o por análisis doble isotópico. Ya hemos comentado la imprecisión de unos métodos y la dificultad de otros aunque en el diagnóstico de hiperaldosteronismo es claro que los procedimientos basados en estos métodos analíticos son los más eficaces en el diagnóstico y estudio del proceso.

La confirmación mediante la medición directa de la triada de hipertensión, producción de Aldosterona aumentada y producción disminuída de renina ha sido hasta ahora la orientación básica en el diagnóstico (165-185). Utilizando la medida directa de estos parámetros, Biglieri ha introducido un test de supresión para el diagnóstico diferencial entre hiperaldosteronismos primarios y secundarios en el que la administración de desoxicorticosterona no produce supresión de la producción de Aldosterona en presencia de hiperaldosteronismo primario suprimiendo esta producción en el caso de hiperaldosteronismos secundarios mediante la supresión del

sistema renina-angiotensina (186-187). Este test ha supuesto un gran avance diagnóstico aunque su uso queda limitado por la necesaria hospitalización y el tiempo requerido de cuatro días. Además la imprecisión de las medidas urinarias de Aldosterona hacen necesaria la medida de secreción en 24 horas para mayor exactitud, lo cual limita aún más el procedimiento.

Recientemente Biglieri ha descrito una modificación de su test de supresión utilizando Fluorocortisona vía oral (272). Una prueba indirecta para el diagnóstico diferencial de los hiperaldosteronismos primarios y secundarios es la ideada por Kaplan y Silah de infusión de Angiotensina cuyos resultados han sido revisados recientemente por Guedon (189), y que consisten en la infusión intravenosa de Angiotensina viendo la cantidad, expresada en ng/Kgr/minuto, que provoca una elevación diastólica de 20 mmHg. En aldosteronismo primario la dosis necesaria sería de unos 3 a 4 ng/Kgr/minuto y en casos secundarios de 6.5 ng/Kgr/minuto.

Un importante avance en el diagnóstico y localización de adenomas productores de Aldosterona fue el estudio mediante cateterización de niveles de Aldosterona en plasma de vena suprarrenal (141), siendo este método junto con la flebografía suprarrenal de una gran precisión en la localización de adenomas (165).

Es evidente, en vista de la dificultad de los métodos directos y la imprecisión de los indirectos, que no existe un test suficientemente simple y preciso que permita seleccionar pacientes con hiperaldosteronismo primario entre enfermos afectos de hipertensión.

La medición de niveles de Aldosterona en plasma periférico mediante radioinmunoensayo supondría un gran avance para los

estudios diagnósticos de hiperaldosteronismo ya que es más preciso que la determinación de metabolitos en orina y por supuesto mucho más sencillo que la determinación de secreción o la determinación directa por doble dilución isotópica lo cual permite simplificar y por tanto difundir los métodos diagnósticos de determinación directa.

Como aplicación diagnóstica del método de radioinmunoensayo hemos intentado modificar el test de supresión por mineralocorticoides determinando el efecto supresor en niveles periféricos de Aldosterona, intentando así diferenciar hiperaldosteronismos primarios de secundarios de un modo práctico para su aplicación al diagnóstico diferencial en enfermos hipertensos en régimen ambulatorio.

4 - INTRODUCCION A LOS MECANISMOS DE REGULACION DE LA SECRE-
CION DE ALDOSTERONA.

Actualmente, los mecanismos conocidos en la regulación de la secreción suprarrenal de Aldosterona en el hombre serían, ACTH, sistema Renina-Angiotensina y niveles plasmáticos de sodio y potasio.

ACTH elevaría la secreción de Aldosterona a la vez que la de glucocorticoides, tanto en hombre (188-190), como en cordero (45) y perro (194). El efecto en ratas sería menos acusado (191).

En el hombre, el efecto de ACTH sería relacionado con la dosis de ACTH exogeno, ya que pequeñas dosis estimularían la secreción glucocorticoidea, sin elevar la producción de Aldosterona (192). La acción de ACTH, actuando de manera crónica, sería autolimitada (193) y la sensibilidad de la zona glomerulosa a la acción de ACTH, estaría facilitada por los niveles de Renina circulante (194). La ausencia de ACTH no aboliría la secreción de Aldosterona, pero su presencia permite una respuesta máxima y apropiada de la zona glomerulosa, a fluctuaciones del sistema Renina-Angiotensina (195). ACTH sería responsable de las elevaciones de Aldosterona observadas ante distintos estímulos inespecíficos (196).

El sistema Renina-Angiotensina, es el principal mecanismo en el control de Aldosterona en el hombre (47-194). Angiotensina II actúa directamente en la corteza suprarrenal (45-194), tanto in vivo como in vitro, sin haberse podido demostrar con claridad en que nivel de la síntesis de Aldosterona, se produce la estimulación (197-198).

El sistema Renina-Angiotensina sería responsable de los cambios de producción de Aldosterona, observados con depleción o sobrecarga salina (43-199-200-201).

Durante depleción de sodio, la hipersecreción de Aldosterona sería mediante estímulo del sistema Renina, cuya acción sería mantenida por ACTH, de una manera permisiva (202).

Aunque se ha demostrado repetidas veces la elevación de Renina plasmática durante depleción sódica (42-203-204), recientes trabajos de Best (205), midiendo Aldosterona periférica por un método doble isotópico, indican cierta disparidad entre niveles de Angiotensina II y Aldosterona, en respuesta a depleción sódica en sujetos normales.

En humanos, el posible mecanismo de estímulo de producción de Renina, mediante depleción sódica, sería mediante reducción del volumen intravascular, aunque quizás hubiese un mecanismo separado según Bull (206) y Fabre (207).

Recientes trabajos de Gordon (208), Mogil (209) y Vandes (210), indican que el estímulo de producción de Renina podría realizarse a través del sistema nervioso simpático.

La respuesta de aumento de producción de Aldosterona sería un mecanismo homeostático adecuado para la conservación de sodio y en relación directa a la depleción sódica producida (211).

Las modificaciones en la producción de Aldosterona, producidas por cambios posturales, han sido estudiadas por Balikian (212) y Cohen (200), mediante medidas de secreción y excreción de Aldosterona. Gowenlock (213), estudiando cambios posturales en sujetos sumergidos en agua, sugirió que el efecto postural de aumento de secreción de Aldosterona sería debido a

cambios hemodinámicos de distribución de fluidos, que consistirían en una redistribución sobre todo a miembros inferiores (214). Que esta acción estimuladora del cambio postural es mediada por el sistema Renina-Angiotensina, ha sido confirmado por Cohen (200-215) y Brown (216), entre otros. Cohen interpreta este cambio postural como un mecanismo compensador tendente a mantener la presión arterial y expandir el volumen plasmático.

El aumento de Aldosterona observado en el cambio postural sería determinado por un aumento en la secreción, y no por un descenso en el aclaramiento, según han demostrado Balikian et al. (212).

El potasio ejerce una acción estimuladora directa sobre la zona glomerulosa, aumentando la secreción de Aldosterona según estudios in vitro, con suprarrenales de buey (217) y rata (191).

La perfusión con sales de potasio de suprarrenales aisladas en perros hipofisectomizados y nefrectomizados, produce también aumento de la secreción de Aldosterona (218).

La sobrecarga de potasio en humanos, produce un aumento de secreción de Aldosterona (4-219-220-221). El efecto de la sobrecarga de potasio en sujetos normales sería, según Davis (47), a través de un estímulo directo de los niveles elevados de potasio en plasma y por pérdida de sodio secundaria a dicha sobrecarga que conduciría a la activación del sistema Renina-Angiotensina.

Recientemente, Funder et al. (222), han demostrado un efecto estimulador directo de potasio sobre la secreción de Aldosterona en suprarrenal autotransplantada de cordero,

independientemente de balance positivo o negativo de sodio.

Por otra parte, Maebashi et al. (223), han demostrado un efecto supresor de la ingestión de potasio sobre el sistema Renina-Angiotensina en sujetos normales, lo cual indicaría que el efecto estimulador de potasio sobre Aldosterona sería por un mecanismo directo exclusivamente.

Recientes estudios realizados por Abbrecht y Vandes (224-225) y por Sealey (226), indican la posibilidad de que los niveles de potasio en plasma ejerciesen un efecto directo sobre el riñón, estimulando o inhibiendo la producción de Renina independientemente de los niveles de Aldosterona o del balance de sodio. Por otra parte, Angiotensina II tiene un efecto directo de elevación de niveles plasmáticos de potasio, aunque no en niveles suficientes para estimular la secreción de Aldosterona (194).

En la primera parte de esta introducción, ya hemos mencionado los efectos de sodio plasmático sobre la mácula densa y la producción de Renina. Blair-West (45) y Davis (218), han demostrado una acción estimuladora directa de los descensos de sodio plasmático sobre la secreción de Aldosterona, aunque este factor sería de poca importancia clínica, siendo el volumen intravascular un factor más importante en la regulación Renina-Angiotensina Aldosterona (227).

El efecto del magnesio en la secreción de Aldosterona ha sido estudiado por Ginn y Cade (228), que encontraron en ratas deficientes en magnesio un aumento de secreción de Aldosterona. Este hallazgo ha sido vuelto a confirmar recientemente por Ginn y Cade, que han vuelto a observar el mismo fenómeno que en su primer trabajo (229), utilizando distinta metodología.

Blair-West et al. (230), han estudiado la acción local de magnesio y calcio en suprarrenal autotransplantada en cordero, encontrando que un aumento de magnesio plasmático de 1-6 mEq/L no afecta la secreción de Aldosterona.

La existencia de un posible factor pituitario anterior, controlador de la secreción de Aldosterona, ha sido propuesto por Palmore (231), a partir de estudios en ratas en las que hipofisectomía anula la respuesta a depleción de sodio, mientras que inyecciones de extractos de pituitaria vuelven a permitir dicha respuesta, mientras que inyecciones de ACTH, hormona de crecimiento o ACTH más tiroxina, no producen dicho efecto.

La existencia de este factor ha sido propuesto también recientemente por Lee et al. (232), a partir de estudios similares en ratas.

Williams et al. (233), estudiando en enfermos con panhipopituitarismo la respuesta de la secreción de Aldosterona a la restricción sódica y a la estimulación con ACTH, concluyen que habría otro factor pituitario distinto de ACTH, que permitiría la respuesta a la depleción sódica.

Diversos autores han investigado la hipótesis de un centro diencefálico, regulador de la secreción de Aldosterona, siendo hasta ahora la evidencia negativa, tanto en el perro (234-235) como en oveja (236), pareciendo pues que el sistema nervioso central actuaría en la secreción de Aldosterona a través de ACTH, pero no hay evidencia a favor de otro mecanismo nervioso central (47).

La hipótesis de que existirían receptores nerviosos periféricos en la carótida, como vía aferente para el control

de la secreción de Aldosterona, fue rebatida por Carpenter (237) y Davis (238). Recientemente, Edmonson (239) ha observado que dosis altas de Angiotensina estimulan los baroreceptores del seno carotideo.

Burstyn, observando el efecto de Aldosterona en el seno carotideo, concluye que Aldosterona estimularía directamente en los baroreceptores, produciendo hipertensión (240).

Hay evidencia de la existencia de un ritmo circadiano en la secreción de Aldosterona. Los pocos estudios publicados (241-242-243-244-245) concuerdan en que existiría mayor excreción de Aldosterona durante el día, en particular las primeras horas, que durante la noche. Los estudios más completos realizados, han sido los de Wolfe. Estudiando los niveles de Renina en plasma de sujetos normales (246) en posición supina, observa una variación con niveles más elevados entre 2 A.M. y 8 A.M. y más bajos entre mediodía y 6 P.M. En sujetos en posición erecta, este cambio posicional produciría un estímulo mayor para la producción de Aldosterona en la mañana que en la tarde. Estudiando la secreción de Aldosterona, mediante el análisis de Aldosterona en orina fraccionada (245) y eliminando el efecto de ACTH mediante supresión con Dexametasona, llega a la conclusión de que es la postura corporal el factor principal determinante del ritmo circadiano, y que estos cambios serían determinados por modificaciones en la actividad plasmática de Renina.

De gran interés en el estudio de los mecanismos de regulación de la secreción de Aldosterona, han sido los estudios hasta ahora realizados en animales y hombres anéfricos, ya que al eliminar el sistema Renina-Angiotensina, se

pueden evidenciar otros factores que influyeran esta secreción.

Experimentos realizados por Davis (247) y Ganong (248), demostraron que la nefrectomía realizada en perros hipofisectomizados y deplecionados de sodio, producía un descenso en la secreción de Aldosterona y que la ausencia del sistema Renina-Angiotensina previene la elevación de secreción de Aldosterona en respuesta a hemorragia.

Diversos autores han indicado diferencias entre diversas especies respecto al mecanismo responsable de la respuesta de Aldosterona a la depleción sódica.

En cordero hipofisectomizado y deplecionado de sodio, la nefrectomía produce un descenso de la producción de Aldosterona, sin que la hipofisectomía tenga efecto significativo, indicando que en cordero el sistema Renina-Angiotensina sería mediador en la respuesta a la depleción sódica (249).

Parece ser, según estudios recientes, que el sistema Renina-Angiotensina ejercería un papel permisivo más que primariamente estimulador, en la respuesta de Aldosterona a la depleción sódica (250).

En el perro deplecionado de sodio, la respuesta a la nefrectomía sería similar a la del cordero (241-248).

Por el contrario, en la rata, existe el interrogante sobre el verdadero papel del sistema Renina-Angiotensina, pues diversos autores han indicado el mínimo efecto de la administración aguda o crónica en la secreción de Aldosterona en la rata in vivo (251-252) e in vitro (253). En la rata, la nefrectomía no causaría un descenso en la secreción de Aldosterona y la depleción sódica causaría una respuesta normal (25

persistiendo la hipersecreción de Aldosterona aún en ausencia del sistema Renina-Angiotensina.

El desarrollo de un método de determinación plasmática de Aldosterona práctico y preciso como el radioinmunoensayo, y las posibilidades que la hemodiálisis crónica ofrecen en el mantenimiento de enfermos anéfricos, permiten el estudio de la regulación de Aldosterona en humanos anéfricos. Nosotros hemos intentado dilucidar el mecanismo de regulación de Aldosterona ante el estímulo de depleción isométrica de volumen en humanos anéfricos, intentando resolver el interrogante planteado por las discrepancias observadas en distintas especies.

Como aplicación inmediata del radioinmunoensayo, hemos querido estudiar el comportamiento de los niveles normales de Aldosterona en sujetos normales, en condiciones basales y ante distintos estímulos e inhibiciones, como un estudio general previo a la aplicación clínica de la medición de estos niveles. Hemos estudiado las variaciones producidas en los niveles de Aldosterona periféricos con el estímulo postural, estableciendo los valores normales en estas situaciones. También hemos estudiado la posibilidad de variaciones diurnas en los niveles de Aldosterona, como estudio previo a la elaboración de métodos diagnósticos de hiperaldosteronismo.

También hemos estudiado el efecto de depleción y sobrecarga salina en los niveles plasmáticos de Aldosterona en sujetos normales, con el fin de evidenciar los cambios en estos niveles, producidos por dichas maniobras como un estudio general de la regulación de los niveles periféricos de la hormona y como comprobación in vivo de la utilidad del radioinmunoensayo.

P A R T E I - Desarrollo del método de Radioinmuno-
ensayo. Resultados Experimentales.

A - PARTE I DESARROLLO DEL METODO DE RADIOINMUNOENSAYO.
RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Reactivos y aparatos.

Diclorometano (CH_2Cl_2) (espectroanalizado)

Etilenglicol (certificado ACS)

Acetona (espectroanalizada)

Tolueno (certificado ACS)

Eter-Petróleo (certificado ACS)

Los reactivos anteriormente citados, fueron obtenidos de Fisher Scientific Company.

Propilenglicol (Cromatográfico) obtenido de Matheson Coleman and Bell.

Etanol. Etanol absoluto de Fisher fue purificado de la siguiente manera: 2 L. de Etanol absoluto mezclados con dinitrofenilhidrazina (4 gr) y 0,5 ml de SO_4H_2 concentrado, en reposo durante 14 h. Luego es destilado utilizando una columna de Tigreaux.

Carbón activado. Fisher Norit A

Dextrano. 70 Pharmacia

Liquifluor. (New England Nuclear Corp.)

Scintisol. (Isolab Incorporated)

Aluminio Oxido Celite G. Merck

Silica Gel G F₂₅₄ Merck

Esteroides

Aldosterona inerte obtenida de E. Merck, Darmstadt, Alemania, y purificada en cromatografía en capa fina de Celite G, impregnado con propilenglicol con dos desarrollos en Tolueno: CH_2Cl_2 (90:10) saturado con propilenglicol.

Una vez purificada la aldosterona, se eluye de celite con cantidad mínima de CH_2Cl_2 y diluyendo con etanol absoluto se cuantifica por absorción ultravioleta a 240 nm.

Conociendo la lectura a 240 nm = O.D. el peso molecular = 360,4 y E máxima = 16000 se calcula la concentración de la disolución:

$$\frac{\text{O.D.}}{16.000} = \text{Moles/litro}$$

Una vez cuantificada, se hacen diluciones de almacenamiento y de trabajo en 50% etanol acuoso.

1-2 H³ Aldosterona

Obtenida de New England Nuclear Corporation, con una actividad específica de 49 C/mM.

Antes de su uso es purificada en cromatografía de capa fina en el mismo sistema que la aldosterona inerte.

La disolución es transferida a un frasco volumétrico con 50% etanol acuoso y la concentración determinada por conteo en contador de centelleo de partes alicuotas de la disolución.

Aldosterona - γ - Lactona

Preparada a partir de aldosterona purificada por oxidación peryodada con $0,1 \text{ M H I O}_4$ en 2% Piridina según el método descrito por Ulick y Vetter y repurificada por cromatografía en papel (Whatman #2) en ciclohexano-benceno-metanol-agua (5:3:5:1, fase superior).

1-2- H^3 Aldosterona - γ - Lactona

Preparada por oxidación peryodada y purificación de 1-2- H^3 Aldosterona al igual que aldosterona - γ - lactona, excepto que el papel cromatográfico es analizado para picos de radioactividad en un Contador Scanner Packard.

Otros esteroides

Los siguientes esteroides han sido utilizados también en los estudios de especificidad de los antisueros y en estudios de separación cromatográfica.

Esteroides tritriados1-2- H^3 Cortisona

New England Nuclear NET-183 (0,25 mC/0,0017 mg)

1-2- H^3 Hidrocortisona

New England Nuclear NET-185 (45 c/mM)

Esteroides inertes

Cortisol

Cortisona

Progesterona

Testosterona

17-B-Estradiol

Corticosterona

18-OH. desoxicorticosterona
 Etioacido de corticosterona
 Etioacido de hidrocortisona
 18-OH Corticosterona lactona
 18-OH Desoxicorticosterona lactona

Los esteroides Progesterona, Testosterona, 17-B-Estradiol, Corticosterona, Hidrocortisona, Cortisona, fueron conseguidos de Steraloids Inc. y repurificados en cromatografía antes de su uso.

Los esteroides o derivados 18-OH-B, 18-OH-Doca, Etioácido de hidrocortisona y Etioácido de corticosterona, fueron proporcionados por la Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, Mass.

Los derivados lactónicos de 18-OH DOC y 18-OH-B fueron preparados por oxidación peryódica con el mismo método que la aldosterona-lactona antes citado.

Todos los esteroides citados fueron prepurificados antes de su uso mediante cromatografía y las distintas diluciones de trabajo estandarizadas por medio de absorción ultravioleta.

Los nombres triviales usados son los siguientes:

Cortisol = 4-Pregnen-11 β , 17 α , 21 - Triol - 3, 20 - diona
 Aldosterona = 4-Pregnen-11 β , 21-diol-3,18,20-Triona
 Progesterona = 4-Pregnen, 3-20-diona
 Testosterona = 4-Androsten-17 β -ol, 3-ona
 Cortisona = 4-Pregnen-17 α , 21-diol-3,11,20-Triona
 Corticosterona = 4-Pregnen-11 β , 21-diol-3,20-diona
 17- -Estradiol = 1,3,5 (10)-Estratrien-3, 17 α -diol
 Desoxicorticosterona = 4-Pregnen-21-ol-3,20-diona

DisolucionesDisolución equilibradora de fosfato (buffer-fosfato)

Se prepara disolviendo 9,94 gr. de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 17,34 gr. de Na_2HPO_4 anhidro en 2 litros de agua destilada y ajustando la disolución a pH 7,00 si es necesario. Se almacena a 4° hasta su uso.

Disolución azul de Tetrazolium

A - 100 mgr. de azul de Tetrazolium se disuelven en 100 ml. de H_2O .

B - 160 gr. de NaOH se disuelven en 300 ml. de H_2O . Enfriar y añadir 200 ml. de metanol.

Antes de usar añadir 5 ml. de disolución A a 45 ml. de disolución B y mezclar en el nebulizador.

Placas de Celite

Preparadas en el laboratorio con 40 gr. de Celite G, suspendidos en 80 ml. de agua. La suspensión se extiende sobre 5 placas de vidrio de 20 x 20 cm. lavadas con etanol. El extendedor usado debe dar un grosor de capa de 375 nm. Las placas se dejan secar a temperatura ambiente y son activadas en posición vertical en horno a 95° durante 1 hora.

Se dejan enfriar en posición vertical a temperatura ambiente y se almacenan en armario desecador hasta su uso.

Placas de Silica Gel G.F.

Preparación igual que placas de Celite, utilizando Silica Gel G.F.

Disolución de conteo

La disolución de conteo utilizada durante todos los experimentos, es preparada con 84 ml. de Liquifluor y 200 ml. de Scintisol diluidos con Tolueno hasta 2 litros.

La efectividad de esta disolución para conteo de tritio se calculó contando un estandard de Tritio Tolueno, disuelto en 10 ml. de la disolución de conteo. También se midió la efectividad añadiendo a la mezcla 0,5 ml. de Buffer fosfato, produciendose así un especimen similar a los utilizados en los experimentos.

Los resultados están indicados en la Tabla n° (1).

El valor absoluto del estandard utilizado y corregido por tiempo transcurrido desde su fabricación era

$1,72 \times 10^6$ desintegraciones por minuto.

de aquí que:

Eficiencia sin Buffer-fosfato	32,27%
Eficiencia con Buffer-fosfato	31,26%

	Tiempo conteo <u>minutos</u>	Conteo <u>total</u>	<u>C.p.m.</u>	C.p.m. corregido <u>b.k.g.</u>
B.k.g.	50	1017	20	---
B.k.g. buffer fosfato	50	1050	21	---
H ³ Tolueno con buffer f.	16.65 16.65	900.000	54057	54033
H ³ Tolueno	16.20 16.06	900.000	55797	55777

Estandar corregido = 1.728×10^6 D.P.M.

Eficiencia sin buffer fosfato 32.27%

Eficiencia con buffer fosfato 31.26% .

TABLA - I

Eficiencia para tritio de la disolución de conteo utilizada:

Liquifluor:Scintisol:Tolueno (84:200:2000).

Pipeta automática Eppendorf con puntas cambiables de 0,5 ml.

Eppendorf Co. Alemania. Cuando es utilizada con pipetas desechables Pasteur, hay que utilizar unas válvulas adaptadas de goma que unen las dos pipetas.

Las mediciones de las pipetas automáticas fueron calibradas periódicamente por pesada de agua corregida para temperatura, considerandose satisfactoria una variación de $\pm 0,5\%$.

Columnas de elución

Para eluir un esteroide de áreas pequeñas del soporte cromatográfico utilizado, se han usado unas microcolumnas hechas en el laboratorio con micropipetas Pasteur de $5 \frac{3}{4}$ pulgadas, con el extremo de salida de la porción ancha de la pipeta obstruido con fibra de vidrio y estrechadas en su parte superior, por el que se introduce el soporte cromatográfico a eluir (celite o silica gel) por medio de succión de vacío. Estas microcolumnas son lavadas en CH_2Cl_2 repetidamente antes de ser utilizadas y desechadas después de su uso.

Contador de centelleo

El utilizado en todas las mediciones fué un contador de centelleo líquido Packard Tricarb - 3200.

Para la identificación de picos de radioactividad en papel cromatográfico en los experimentos en que ésto fuese necesario se utilizó un contador Packard scanner.

Viales de conteo

Viales de cristal libre de potasio de bajo BKG Packard.
Los viales son desechados después de su uso.

Fotofluorómetro Turner

Utilizado en el método de determinación de aldosterona en plasma de vena adrenal para su cuantificación, adaptándolo para medición continua de soda fluorescencia en el papel cromatográfico.

A-1 Introducción Metodológica. Radioinmunoensayo.

Los diversos experimentos que a continuación se describen, fueron realizados en las etapas iniciales del desarrollo del método y los resultados obtenidos en los distintos estudios son los que condujeron al método definitivo o estándar, descrito en la sección siguiente y que fué el utilizado para la determinación de aldosterona en los estudios clínicos.

Los estudios descritos en esta sección están agrupados en varios apartados, según la etapa estudiada del método, aunque no indica que estén realizados sucesivamente.

Cuando los resultados de una experiencia llevaron a la modificación de un paso del método, dicha modificación se expresa en el experimento correspondiente.

Los distintos apartados en que hemos agrupado los experimentos son los siguientes:

1. Radioinmuncensayo

- a) Separación de esteroide libre y unido
- b) Condiciones de equilibrio
- c) Tratamiento de Tubos

2. Antisueros

- a) Método de formación
- b) Estudios de longevidad de las diluciones
- c) Adición de gammaglobulina
- d) Especificidad, reacciones cruzadas

3. Purificación previa al radioinmunoensavo

- a) Extracción
- b) Partición
- c) Cromatografía en capa fina

Como descripción general de la metodología seguida y como aplicación concreta a la teoría general de radioinmunoensayos descrita en la introducción general, lo que se intenta analizar a lo largo de los experimentos descritos en esta sección, son las distintas etapas en el proceso de purificación de aldosterona y las distintas condiciones del radioinmunoensayo, que lleven a la descripción de un método lo más sensible y específico posible.

Los estudios del sistema del radioinmunoensayo en sí, consisten en incubar en tubo de ensayo la cantidad a medir del esteroide inerte, con una disolución de anti-suero anti-esteroide y esteroide marcado con tritio. Una vez equilibrado el sistema quedará unido al anticuerpo una cantidad de esteroide marcado, en relación inversa a la cantidad de esteroide inerte presente en el sistema. Entonces se separa el esteroide libre del marcado por medio de un adsorbente que adsorba la fracción libre.

Midiendo la cantidad de esteroide marcado, unido al anticuerpo, en relación con distintas cantidades estándar de esteroide inerte, se construiría una curva estándar de cantidad de esteroide marcado unido en función de cantidad inerte, extrapolarlo de esta curva las cantidades desconocidas de esteroide inerte en función de la cantidad de esteroide unido en el sistema.

En los siguientes experimentos, todos los estándares y en su caso las muestras problema, son realizados en triplicado.

Los estándares de esteroide son pipeteados en tubos de ensayo y secados en horno de vacío a 30°.

En los estudios iniciales, se han estudiado distintos antisueros que se especifican en página (78), que son antisueros antialdosterona lactona (series 137 y 138) y antisuero antialdosterona (088).

En el caso en que se utilizan los antisueros 137 y 138, los standards y el esteroide marcado, serán aldosterona-lactona y 1-2 H³ aldosterona-lactona respectivamente.

En los experimentos en que se utilice el antisuero 036, los esteroides utilizados serán aldosterona y 1-2 H³ aldosterona.

O - F

El llamado O-fosfato (O-F), se refiere a un factor de corrección utilizado en la curva standard y en el cálculo de las muestras destinado a corregir cada resultado individual, por la fracción de esteroide libre, que no ha sido removido por el adsorbente utilizado en la separación de esteroide libre y unido al antisuero consiste en una disolución de la disolución equilibradora de fosfato, utilizada en el procedimiento, con una concentración de esteroide marcado exactamente igual a la concentración en que dicho esteroide marcado se encuentra en la disolución de antisuero-esteroide marcado.

Utilizando la misma cantidad de esta disolución que de la compuesta por H³-esteroide-antisuero y sometiendo al mismo procedimiento de separación, la cantidad de esteroide marcado que quede libre en el sobrenadante habrá que corregirla en el resto de los tubos (standards y muestras) pues indica la fracción de esteroide libre no adsorbida por el sistema separador.

En general 1,5-2% de esteroide libre, no es separado por los adsorbentes estudiados.

En un principio, el esquema del método a desarrollar consistía en la purificación de aldosterona por extracción, partición y cromatografía, lactonización, nueva purificación por un segundo sistema cromatográfico y cuantificación final en el sistema de radioinmunoensayo, utilizando un antisuero antialdosterona lactona.

El fin perseguido con la lactonización era, por una parte su mayor estabilidad en comparación con aldosterona, y por otra parte, se pensó que la especificidad del anticuerpo sería mayor y la interferencia final menor. En el curso de los estudios descritos a continuación, se vió que la especificidad del antisuero antialdosterona era muy satisfactoria, tanto o más que la de los antisueros antilactona. Además, los reactivos del método utilizado para la lactonización producían interferencias inespecíficas en el sistema de cuantificación. Por otra parte, utilizando aldosterona y no su lactona, se simplificaba el método, evitando una etapa de lactonización y una cromatografía sin deterioro de la exactitud y precisión del método.

a. - Condiciones de separación de fracciones libre y unida.

En los experimentos descritos a continuación, se estudian las distintas condiciones de separación.

En general, el principio se basa en equilibración de la solución de esteroide inerte, esteroide marcado y antisuero.

Una vez conseguido el equilibrio, se separa el esteroide libre por medio de un adsorbente y se mide la cantidad

de esteroide marcado que ha quedado unido al anticuerpo, midiendo la radioactividad de una parte alicuota del sobrenadante (solución de anticuerpo con esteroide unido).

En los experimentos que a continuación se describen, se ha utilizado carbón activado como medio de separación, estudiándose distintas condiciones de separación y distintos recubrimientos de las partículas de carbón

El protocolo general de separación utilizado en los experimentos descritos, es el siguiente:

Aparte de los tubos estandard y los tubos muestra, siempre se usan tubos totales y tubos 0, que no contienen esteroide inerte.

Una vez secos los tubos estandard y los tubos muestra a éstos y a los tubos totales y 0 se les añade 0,5 ml. de la solución antisuero-esteroide marcado, utilizado en cada experimento.

Los tubos 0-fosfato y total fosfato descritos antes, contienen 0,5 ml. de la solución fosfato-esteroide marcado.

Los tubos total-antisuero y total-fosfato, no se someten al procedimiento de separación, sino que se les añade 0,5 ml. del buffer-fosfato utilizado y después de mezclar, se mide la radioactividad de 0,5 ml. parte alicuota, que servirá para, a partir de esa cantidad total, calcular el porcentaje de esteroide unido en los otros tubos.

Los tubos O, OP, standards y muestras, se someten al procedimiento de separación, añadiéndoles 0,5 ml. de la suspensión de adsorbente, y una vez producida la separación, se traslada 0,5 ml. del sobrenadante a un vial de conteo que después de añadir 10 ml. de solución de conteo se medirá su radioactividad en un contador de centelleo.

En todos los experimentos se usa 0,5 ml. de buffer-fosfato, utilizado con 10 ml. de solución de conteo como BKG.

Cálculos

La media de cada grupo de triplicados se corrige para BKG y O-fosfato y se divide por cpm totales en 0,25 ml. de la solución antisuero-esteroide marcada (tubos suero-total) que dará el porcentaje unido en los standards. De aquí se calcula también el porcentaje libre y el cociente libre sobre unido (L/U) y los resultados se llevan a un sistema de coordenadas en función de la concentración de esteroide inerte de los standards.

i - Comparación entre distintos recubrimientos de carbón activado.

Se han estudiado 3 sistemas de separación.

A - Carbón activado recubierto de metilcelulosa

Suspensión de 500 mgr. carbón activado (Fisher Norit A) y 50 mgr. de metilcelulosa (Fisher 400 cps) en 200 ml. de buffer-fosfato.

B - Carbón activado recubierto de dextrano

Suspensión de 500 mgr. carbón activado (Fisher Norit A) y 50 mgr. dextrano +70 (Pharmacia P.M. 70.000) en 200 ml. de buffer-fosfato.

C - Carbón activado

Suspensión de 500 mgr. carbón activado (Fisher Norit A) en 200 ml. de buffer-fosfato.

La solución antisuero-esteroide marcado, utilizada es antisuero 138 (6-30-70) a 1:400.000, con 128 pgr/ml de H³ aldosterona-lactona.

Se hicieron tres curvas standard, cada una tratada con un distinto adsorbente. Las condiciones de adición de suero, incubación y método de separación, fueron las mismas que en procedimiento standard (p. 139).

Los resultados expresados en la tabla n° (2) indican que el carbón activo no recubierto, tiene menor capacidad para adsorber esteroide libre, ya que el valor de O-P es más elevado. Las suspensiones de carbón recubierto de dextrano o metilcelulosa son comparables.

ii - Comparación de condiciones de agitación del sistema adsorbente.

Se realizaron diversos experimentos, para determinar la capacidad de separación del carbón activo recubierto de dextrano con distintos tipos de agitación una vez añadido éste.

Estos experimentos se realizaron en las condiciones de incubación y temperatura descritos en el método standard.

En Tabla (3) se comparan dos curvas standard. La curva A fué obtenida agitando los tubos de

	<u>Carbon no recubierto</u>	<u>Carbon recubierto de Dextrano</u>	<u>Carbon recubierto de Metilcelulosa</u>
0-Fosfato	168 cpm.	46 cpm.	17 cpm.
0-Suero	58% Unido	64% Unido	66% Unido
100 ng.	7% Unido	10% Unido	11% Unido
Caida en % unido			
0-20 pg.	14,5%	15,8%	15,5%
0-50 pg.	28,3%	28,9%	29,1%
0-100 pg.	34,8%	38,3%	39,1%
0-200 pg.	42,3%	43,5%	46,4%

TABLA 2

Separación de las fracciones Libre y Unida utilizando carbón activado sin recubrir y recubierto de Dextrano o de Metilcelulosa.

	<u>Tiempo</u> <u>Conteo</u>	<u>Conteos</u> <u>Totales</u>	<u>c.p.m.</u> <u>corregido</u> <u>BKG</u>	<u>%</u> <u>Unido</u>	<u>%</u> <u>Libre</u>	<u>Libre</u> <u>Unido</u>
BKG	50	1078	21.56			
Total	4.00	10,000	2441			
	4.01					
0-A	7.33	10,000	1391	56.98	43.02	0.75
	7.30					
50-A	12.43	10,000	758	31.06	68.94	2.22
	11.92					
100-A	18.51	10,000	519	21.27	78.73	3.70
	18.43					
0-B	7.74	10,000	1375	56.33	43.67	0.77
	6.94					
50-B	11.15	10,000	864	35.40	64.60	1.82
	10.81					
100-B	18.77	10,000	533	21.85	78.15	3.58
	17.21					
	18.09					

TABLA 3

Curva A - Agitación 45 segundos

Curva B - Agitación 20 segundos

ensayo durante 45 segundos una vez añadido el carbón activo. Curva B en las mismas condiciones, pero agitando sólo 20 segundos. Las curvas son semejantes.

En fig. (1) se comparan dos curvas standard. La diferencia metodológica en los dos experimentos, consiste en que en el representado por la curva C, los tubos fueron agitados durante 30 segundos inmediatamente antes de centrifugación. En el representado por la curva D, los tubos fueron dejados en reposo una vez añadido el carbón-dextrano hasta la centrifugación. Como se ve, no existe diferencia de adsorción de esteroide libre y el simple descenso de la suspensión de carbón-dextrano sobre la solución esteroide-antisuero, produce una máxima separación de esteroide libre sin necesidad de agitación.

También se estudiaron distintas condiciones de agitación y reposo, pero ninguna de ellas dió resultados más satisfactorios que las condiciones de reposo descritas.

iii - Condiciones de tiempo de equilibrio y temperatura del sistema de separación.

En fig. (2) se representan las 3 curvas resultado de las siguientes condiciones:

Curva A Equilibrio entre antisuero-esteroide marcado - esteroide inerte durante 3 h. a 20°.

La suspensión de carbón-dextrano fué añadida a 20°.

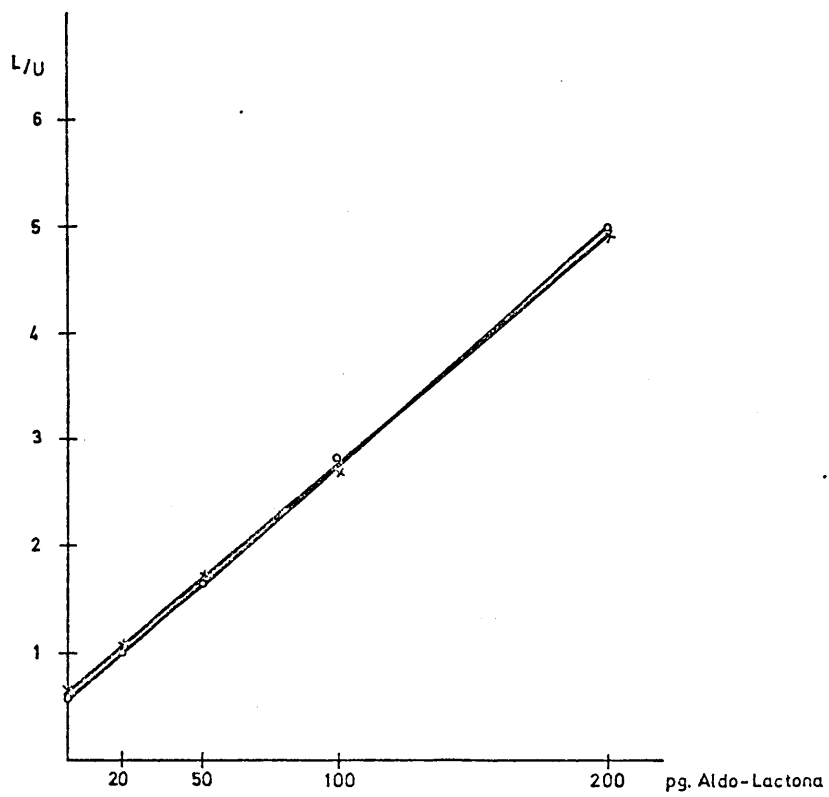


FIG. 1

o - C Agitación 30 segundos
x - D No agitación

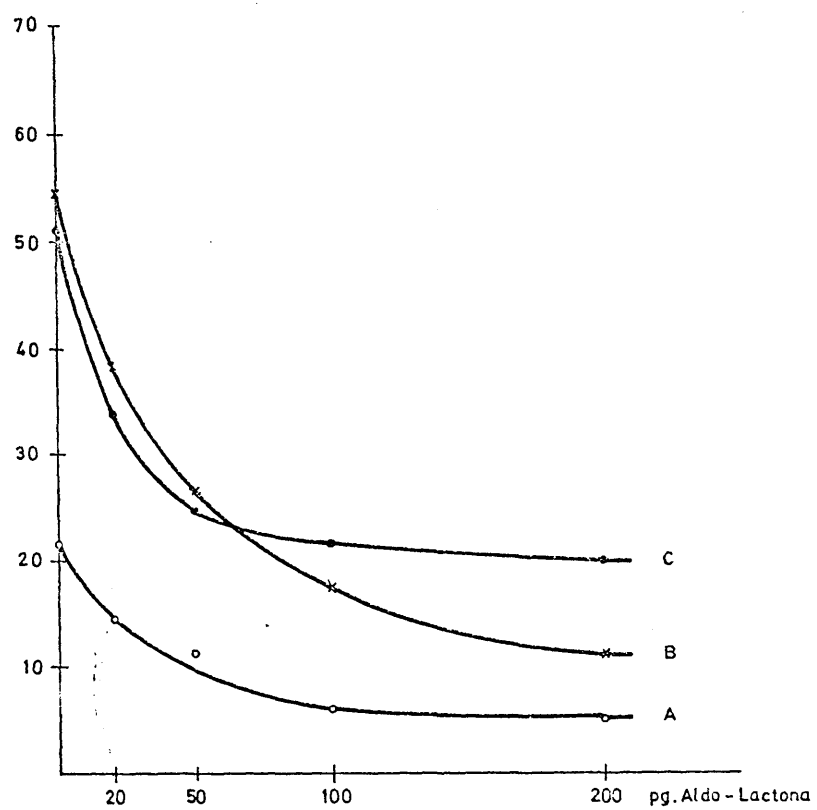


FIG. 2

- A Separación y equilibrio a 20°
- B Separación y equilibrio a 6° 21h.
- C Separación 6°, equilibrio a 20° 3h.

Curva B Equilibrio durante 21 h. a 6°. Suspensión de carbón-dextrano fría (conservada en baño de hielo). Tubos mantenidos en baño de hielo hasta centrifugación.

Curva C Equilibrio durante 3 h. a 20°. Tubos enfriados en baño de hielo durante 10 minutos antes de la adición del carbón-dextrano frío. Tubos en baño de hielo hasta centrifugación.

Las mejores condiciones son las utilizadas en la preparación de la Curva B, en que se produce menos disociación en el origen (0 pgr.) con mayor descenso del % unido.

En este estudio se ha utilizado disolución de antisuero 137 (3-10-70) 1:50.000, con 130 pg/ml de H^3 aldosterona lactona.

iv - Comparación de distintas concentraciones de carbón activado recubierto de dextrano. Estudio de la gravedad de la suspensión de adsorbente.

Para este estudio se investigó la separación producida por las distintas suspensiones del adsorbente en una disolución de antisuero 137 (3-10-70) 1:50.000, con 108 pg. H^3 aldosterona lactona/ml.

Las condiciones utilizadas son las mismas que en el método estándar.

Las distintas diluciones del adsorbente son:

- A - Solución de carbón-dextrano preparada 5 días antes, con 500 mgr. de carbón, 50 mgr. de dextrano y 200 ml. de buffer-fosfato.

De esta dilución se hizo otra al 50% con
buffer-fosfato 0,62 mgr. carbón/0,5 ml.

B - Solución fresca de 25 mgr. carbón, 2,5 mgr.
dextrano y 10 ml. buffer-fosfato
1,25 mgr. carbón/0,5 ml.

C - Solución fresca de 25 mgr. carbón, 2,5 mgr.
dextrano y 20 ml. buffer-fosfato
0,62 mgr. carbón/0,5 ml.

D - Solución preparada 5 días antes como en A,
pero sin diluir 1,25 mgr. carbón/0,5 ml.

En la Tabla (4) se ven los resultados obtenidos,
expresando el tiempo de conteo de los triplicados,
conteos por minuto corregido para BKG, y % unido
con 0 de esteroide inerte.

Como puede verse, los resultados indican que no
hay variación entre capacidad adsorptiva de la so-
lución de carbón conservada en refrigeración a 4°.
Además, comparando A y D, puede verse que 0,62 mgr/ml.
de carbón produce una adsorción máxima de esteroide
libre y que un exceso de carbón-dextrano no cambia
la separación, no siendo necesaria por tanto, una
rigurosa exactitud en la cantidad de solución
adsorbente adicionada al sistema.

b - Condiciones de equilibrio de antisuero con esteroide

En el estudio descrito en p. (67), se ha visto que
utilizando antisuero 137 (3-10-70), el equilibrio
durante 21 horas a 4° - 6° es satisfactorio. En estu-
dios similares realizados con antisueros de la serie 138,

	<u>Tiempo Conteo</u>	<u>Conteos Totales</u>	<u>c.p.m. corregido BKG</u>	<u>% Unido</u>
B.K.G.	50	1011	20,22	---
A 0,62 mgr. 5 días	7,16 7,90 7,19	10.000	1328,09	52.85%
B 1,25 mgr.	7,41 7,31 7,23	10.000	1344,49	53.50%
C 0,62 mgr.	7,42 7,01 7,73	10.000	1333,57	53.06%
D 1,25 mgr. 5 días	7,12 7,38 7,40	10.000	1349,64	53,70%
Total	3,99 3,92 3,93	10.000	2513	---

TABLA 4

Adsorción de la fracción libre de esteroide con suspensiones de carbón activado de distinta concentración y longevidad.

se obtuvieron iguales resultados.

A continuación se describe el estudio de las condiciones de equilibrio realizado con el antisuero 088.

i - Tiempo de equilibrio de antisuero 088

En este estudio se utiliza la disolución de antisuero - H^3 aldosterona, utilizada en el procedimiento definitivo, 1:400.000 de antisuero 088 con 130 pg/ml de H^3 aldosterona y 0,6% de gamma-globulina. La preparación de standards, incubación y separación, es igual que en el método standard variando unicamente el tiempo de equilibrio a 4°.

En la figura (3) pueden verse las 4 curvas standard realizadas. El tiempo de incubación o equilibrio a 4° entre la H^3 aldosterona y la aldosterona estándar fué de:

Curva A	1 hora
Curva B	2 horas
Curva C	19 horas
Curva D	67 horas

La curva más sensible es la curva C. Con 2 horas de incubación, el equilibrio no es suficiente y con 67 horas al parecer se produce una falta de disociación en la primera parte de la curva, disminuyendo la sensibilidad entre los puntos 0 y 50.

A partir de este experimento, el tiempo de equilibrio utilizado fué de 14 a 36 horas a 4° de temperatura.

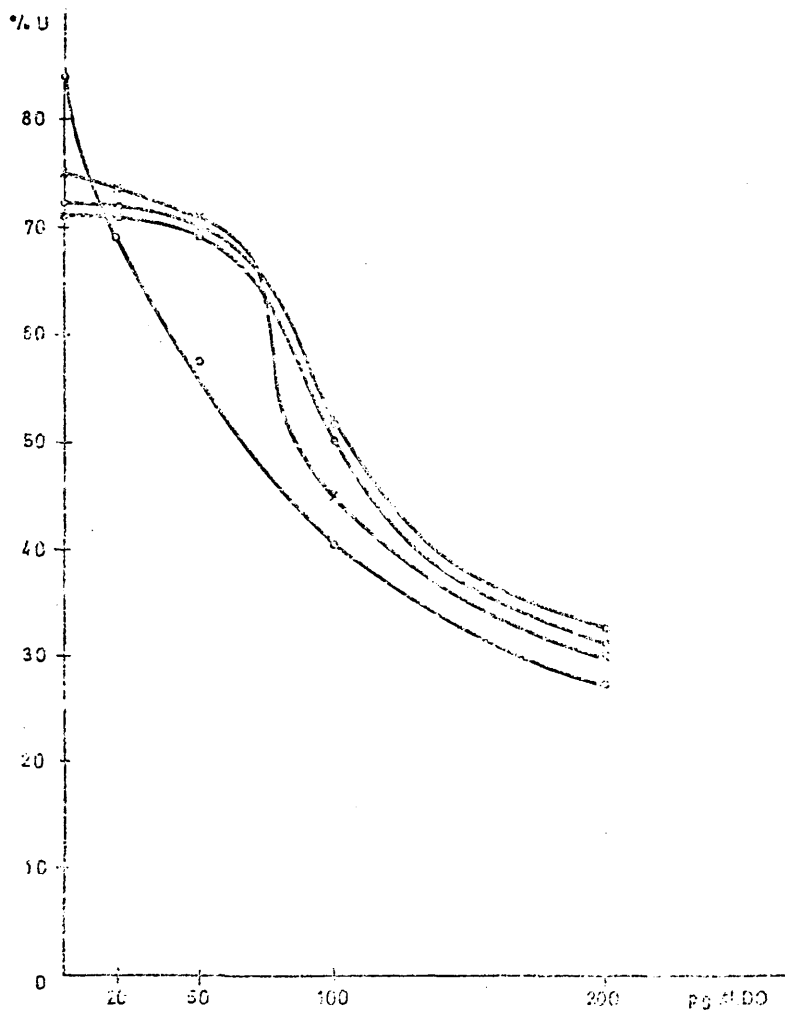


FIG. 3

Disociación 100 ng % U

• A	Equilibrio	1 h.	—	20,4
• B	"	2 h.	---	25,2
• C	"	18 h.	—	27,6
• D	"	67 h.	—	32,1

c - Estudio de la interferencia en el sistema de distintos tratamientos de tubos R.I.E.

En un sistema de radioinmunoensayo en general, el lavado de los tubos en que se equilibra el sistema es de suma importancia, sobre todo en sistemas que utilizan soluciones muy diluidas de anticuerpo o cantidades muy pequeñas de substancia a medias, como el que aquí se estudia, ya que mínimas impurezas pueden competir con el anticuerpo, produciendo resultados erróneos.

A continuación, se describen diversos experimentos realizados para determinar el tratamiento de limpieza de los tubos, antes de ser utilizados en el radioinmunoensayo.

i - Efecto de lavado con ácido

Utilizando disolución de antisuero 137 (3-10-70) 1:50.000 con 108 pg. de H^3 aldolactona y sin adición de esteroide inerte y en las condiciones de separación descritas en el método standard, se compararon 1) tubos 100 x 13 de borosilicato lavados con detergente, agua, agua destilada y etanol, 2) tubos 100 x 13 de borosilicato lavados con detergente, ácido sulfúrico, agua, agua destilada y etanol.

Se utilizaron 10 tubos en cada grupo.

Los resultados fueron:

	% unido
10 tubos lavados con SO_4H_2	46,02
10 tubos lavados sin SO_4H_2	62,20

Estos resultados son la media de los tubos.

Los tubos lavados con ácido, dieron además resultados erráticos. Se deduce que lavado con ácido hay competición entre esteroide y sustancias contaminantes, dando un % mayor de esteroide libre y produciendo además mala duplicación.

ii - Comparación entre distintos sistemas de lavado.

Se utilizó antisuero 137 (3-10-70) 1:10.000 con 128 pg. H³ aldosterona.

Se hicieron tres curvas estandar, utilizando tubos 100 x 13 de borosilicato diferenciándose cada grupo en el tipo de lavado previo a su uso.

- A) No prelavado
- B) Lavados con Etanol x 4
- C) Lavados en solución detergente x 1 h.
agua x 10, agua destilada x 5 y etanol x 4.

En fig. (4) están trazadas las curvas correspondientes a cada grupo. Las tres curvas tienen el punto 0 semejante, separándose después, siendo la curva C la de más sensibilidad, encontrándose en los resultados de las curvas A y B resultados erráticos en los triplicados y menos linealidad como puede verse en los puntos de la curva debido probablemente a contaminantes no eliminados con el sistema de lavado utilizado en estas curvas estandar.

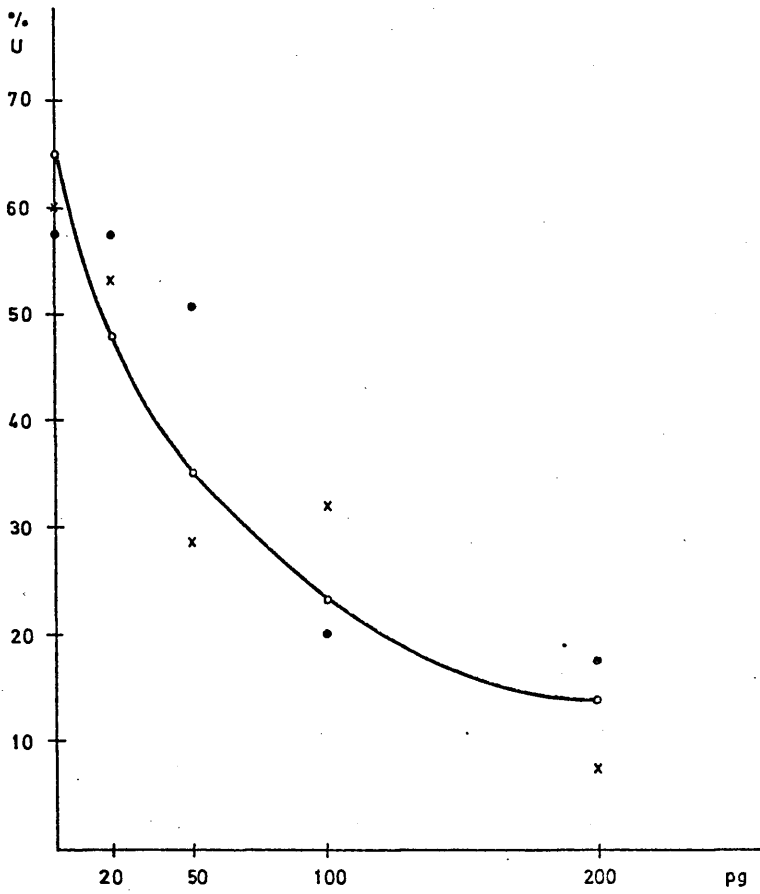


FIG. 4

- x A
- B
- C

A-2 Estudio de antisueros antialdosterona y
antialdosterona- γ -lactona

a - Método de formación de antisueros

Los antisueros utilizados en este estudio, fueron obtenidos por inyección en cordero de un conjugado de D-aldosterona-18, 21-dihemisuccinato con albumina serica D-aldosterona lactona-18, 21-dihemisuccinat

Se inyectó una suspensión del complejo en adjuvante de Frennd en 4 dosis (hombros y caderas).

La descripción del procedimiento de formación del complejo y técnicas de inyección está en preparación para su próxima publicación y fueron obtenidos en la Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, Mass. por R. Hanning y col. (255).

Los antisueros utilizados en este trabajo, pertenecen a distintos animales designados con un número de código.

Antisueros #137 y #138 son antialdosterona lactona y el número añadido a continuación de número de código, indica la fecha en que se obtuvo el antisuero por sangrado del animal correspondiente.

El antisuero #088 es antialdosterona y es el resultado de mezclar suero obtenido en dos sangrados diferentes 11-26-69 y 1-5-70.

Partes alicuotas de los antisueros son separadas en pequeños tubos de ensayo y conservadas a -12° , licuificadas en agua fría para su uso y recongeladas inmediatamente.

b - Titulación de antisueros

Cada antisuero obtenido en distinto período del proceso de inmunización del animal correspondiente, tiene un título distinto, osea una capacidad de unión antigénica diferente.

Por tanto, cada antisuero es usado a distinta dilución que permita obtener una saturación del 50 al 90%, con una predeterminada cantidad del esteroide correspondiente.

Para averiguar esta dilución en cada antisuero obtenido, se hacen distintas diluciones y cada una se equilibra con una cantidad fija de esteroide marcado.

Una vez logrado el equilibrio, se separa el esteroide libre del unido por el procedimiento estandard, viendose así la dilución que produce el porcentaje de saturación deseado.

Benson y Yallow (161) en los primeros estudios generales sobre radioinmunoensayo, preconizaron el uso de diluciones de antisuero y cantidad de radioligando, que diesen una saturación inicial, osea el 0 de la curva estandard de un 50%. En el presente trabajo, se ha visto que independientemente del título del antisuero utilizado, la sensibilidad del sistema aumenta, calibrándolo para obtener una saturación inicial de un 70 a 90%.

c - Estudios de longevidad de las diluciones de antisuero.

Se trató de determinar si el antisuero conservado, diluido en disolución reguladora de fosfato a dilución concentrada 1:1000 o a dilución de trabajo 1:400.000 a 4°, se deterioraba o conservaba sus propiedades de afinidad. Se estudió la posibilidad de utilizar las diluciones de antisuero con suficientes días de separación, para que fuese práctica su utilización en distintas repeticiones del radioinmunoensayo, sin tener que hacer diluciones nuevas cada vez.

Para ello, se realizaron curvas standard, utilizando las mismas diluciones al 1:1000 y al 1:400.000 de distinta longevidad.

i - Antisuero 138

En la Tabla (5) se representan los valores de la curva standard, obtenida con el antisuero 138 (6-30-70).

Curva A: Dilución 1:400.000, conservada 14 días a 4° y hecha a partir de una dilución 1:1000 nueva.

Curva B: Dilución 1:400.000 nueva, hecha a partir de dilución 1:1000, conservada 8 días a 4°.

Curva C: Dilución 1:400.000 nueva hecha a partir de una dilución 1:1000, conservada a -12° durante 30 días.

138 (6-30-70)

	%B	Caida en % Unido				%U. 100 ng.
		<u>0</u>	<u>20</u>	<u>50</u>	<u>100</u>	
A						
1:1000 14 días a 4°	64	16	27	38	46	7.1
1:400.000 14 días a 4°						
B						
1:1000 8 días a 4°	64	15	27	38	46	7.5
1:400.000 nueva						
C						
1:1000 30 días a -12°	64	17	29	38	47	7.0
1:400.000 nueva						

TABLA 5

En la tabla se representan los % unidos para 0 y 100 mgr. standards y la caída del % unido desde 0 para los standards 20, 50, 100, 200 pgr. Como la tabla indica, las tres curvas son totalmente comparables.

ii - Antisuero 088

En la Tabla (6) se representan los resultados de los estudios de longevidad realizados con el antisuero 088.

Curva A: Dilución 1:1000 hasta el mismo día que la 1:400.000 y ésta conservada 4 días a 4°.

Curva B: Dilución 1:1000 25 días a -14° y 1:400.000 6 días a 4°.

Curva C: Dilución 1:1000 40 días a -14° y 1:400.000 10 días a 4°.

Por los resultados en la tabla, se comprueba que las diluciones al 1:1000 pueden conservarse congeladas a -14° al menos 40 días y las diluciones 1:400.000 refrigeradas, a 4°, al menos 10 días sin que haya ninguna pérdida de título del anticuerpo.

d - Estudios de adición de γ globulina inerte al antisuero

Es práctica establecida en algunos sistemas de radioinmunoensayo la adición a las distintas diluciones de antisuero de proteína inerte antigénicamente, con el fin de proteger al anticuerpo durante su manipulación y aumentar su capacidad antigénica. Con objeto

088

	%B	Caida en % Unido				%U. 100 ng.
		<u>0</u>	<u>20</u>	<u>50</u>	<u>100</u>	
A						
1:1000 nueva	80	11	22	38	52	5.1
1:400.000 4 días a 4°						
B						
1:1000 25 días a -12°	80	11	24	37	55	6.0
1:400.000 6 días a 4°						
C						
1:1000 40 días a -12°	80	11	27	41	50	6.0
1:400.000 10 días a 4°						

TABLA 6

de verificar la posibilidad de mejorar la titulación y precisión de los antisueros antialdosterona y anti-aldosterona lactona, se realizaron los siguientes estudios.

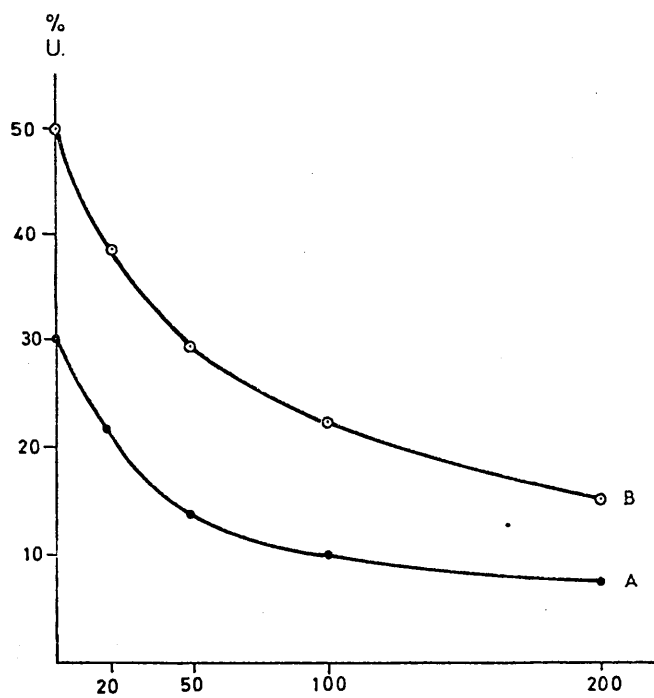
i - Adición de suero de cordero inerte a antisuero 137 (3-24-70)

Para observar el efecto que la adición de una proteína que fuese antígenicamente inerte respecto al antígeno estudiado tuviese sobre el antisuero, la primera observación se hizo adicionando al antisuero una determinada cantidad de plasma del mismo animal, obtenida antes de comenzar el proceso de inmunización.

Se compararon dos curvas estándar a una dilución del antisuero 137 (3-24-70) 1:25.000 y con una concentración de H^3 aldosterona lactona de 130 pg/ml.

En fig. (5) la curva A se obtuvo sin adición de suero inerte y la curva B se obtuvo en las mismas condiciones de equilibrio y separación, pero añadiendo 0,3 ml. de plasma inerte 137 a 50 ml. de la disolución del antisuero 137 (3-24-70) con 130 pg/ml. de H^3 aldosterona lactona.

Como se ve, la adición de plasma inerte produce una elevación del título del anticuerpo, con un valor θ que de 29,93, ascendió a 49,94% de esteroide unido.



- A 137 (3-24-70)-1: 25.000
- B 137 (3-24-70)-1: 25.000 con adición suero inerte

FIG. 5

ii - Adición de γ -globulina humana a antisuero 137
(3-10-70)

Una vez establecida la conveniencia de añadir proteína inerte a la dilución de antisuero, se pensó utilizar γ -globulina humana muy conveniente en cuanto a la posibilidad de poder utilizar siempre una proteína de iguales características.

En la fig. (6) se comparan tres curvas.
Curva A fué obtenida con dilución 1:42.000 de antisuero 137 (3-10-70) con 130 pgr. por ml. de H^3 aldosterona lactona.

Curva B con la misma dilución de antisuero y H^3 aldosterona lactona, pero con 0,6% de γ -globulina humana.

Curva C igual que B, más un 2% de MeOH en la disolución.

La curva con Me OH se estudia por la posibilidad de que la γ -globulina a 0,6% constituyese un exceso proteico, que dificultase el acoplamiento del esteroide al anticuerpo y así con el 2% de metanol precipitar un posible exceso de proteína.

Como se ve en la figura, las curvas B y C representan un mayor título que la curva A, con un % unido en el 0 de la curva de 68,56 y 66,70 respectivamente, en contraposición con curva A, cuyo % unido en el 0 de la curva es de 40,50.

Una posible explicación del aumento de título del antisuero con la adición de γ -globulina, es

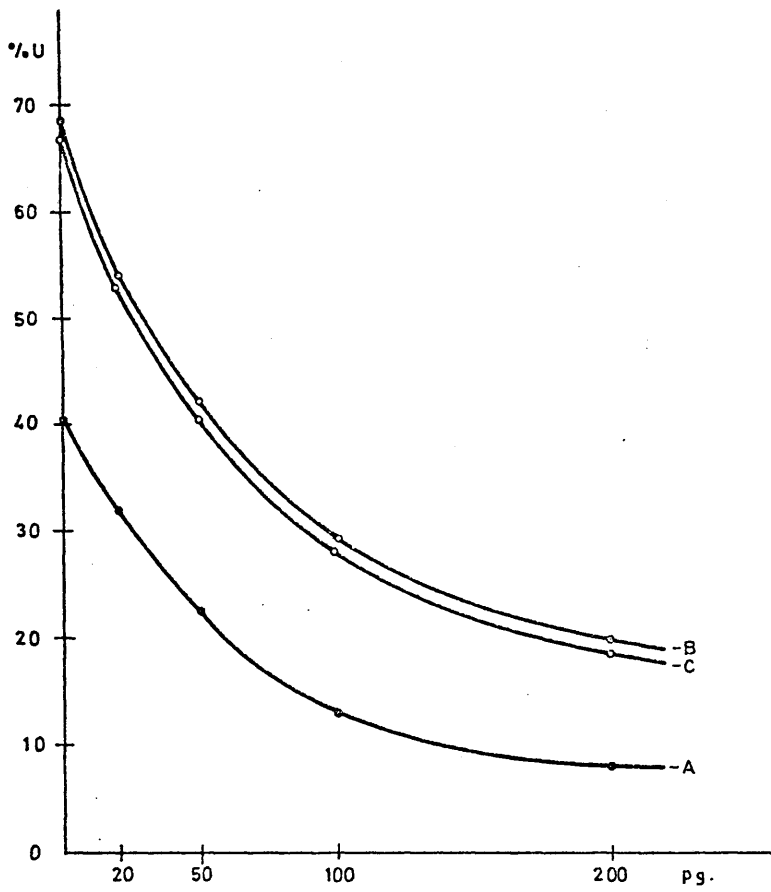


FIG. 6

- A 137 (3-10-70) 1:42.000
- B Adición γ globulina
- C Adición γ globulina y Me OH

que ésta tuviese cierta afinidad por el esteroide actuando como anticuerpo específico en el sistema de equilibrio.

Por ello, hemos medido la capacidad de unión de la γ -globulina usada con el esteroide utilizado.

iii - Afinidad de γ -globulina humana con aldosterona lactona.

Para medir esta afinidad, se preparó una disolución de γ -globulina humana al 0,16% con 130 pgr. de H^3 aldosterona lactona. Después de incubación, se separó el esteroide libre por medio de carbón-dextrano de manera standard.

Los resultados se ven en la Tabla núm. (7).

Como se ve, el % de esteroide marcado que queda unido, es igual al porcentaje que el carbón-dextrano no adsorbe y que en el sistema standard se corrige con el factor fosfato, osea la γ -globulina no tiene afinidad propia con el esteroide.

En vista de estos resultados, que evidencian un aumento del título del anticuerpo con la adición de γ -globulina y viendo también que la especificidad del anticuerpo aumenta con esta adición (ver p. 92), se decidió usar la adición de γ -globulina humana a la dilución de antisuero.

	<u>Tiempo conteo minutos</u>	<u>Conteo</u>	<u>c.p.m. corregidas</u>	<u>% Unido</u>
B K G	100	1988	---	---
Total	3,41 3,39 3,40	10.000	---	---
O	20	1520 1589 1520	57	1,95
O P	50	3354 3740 3359	50	1,76
T P	3,43 3,48 3,49	10.000	---	---

TABLA 7

Afinidad de γ globulina humana y Aldosterona

e - Reacciones Cruzadas.

Especificidad de antisueros.

Un antisuero producido contra un determinado esteroide, no es absolutamente específico, sino que por la similitud de las moléculas esteroideas, se producen reacciones cruzadas entre ellos, aunque el anticuerpo tenga una especificidad mayor para el utilizado como estímulo antigénico.

Por esta falta de especificidad total, es necesario realizar una purificación y aislamiento del esteroide a medir en el sistema, en este caso aldosterona, antes de cuantificarlo en el sistema de radioinmunoensayo.

A menor especificidad del antisuero, será necesaria una mayor separación del esteroide a medir de los otros esteroides naturales, sobre todo teniendo en cuenta que en casos como la aldosterona, su concentración en plasma humano es muy pequeña en relación con otros esteroides como el cortisol.

El método más útil e informativo de estudiar las reacciones cruzadas de un antisuero antialdosterona, consiste en medir en el sistema de radioinmunoensayo distintas cantidades del esteroide que se estudie y ver como interfiere en el sistema, osea el equivalente que el sistema "interpreta" como aldosterona, o en su caso, aldosterona lactona.

En el caso de los antisueros de la serie 137 y 138, osea antisueros antialdosterona lactona, se han estudiado las reacciones cruzadas de los siguientes esteroides:

180H Corticosterona lactona
180H Desoxicorticosterona lactona
Etioácido de Corticosterona
Etioácido de Hidrocortisona
Progesterona
D-Aldosterona
Hidrocortisona
Corticosterona
17- β -Estradiol
Testosterona

En el caso del antisuero 088 antialdosterona, que es el utilizado en el método definitivo estandard, se han estudiado las reacciones cruzadas de los siguientes esteroides:

Hidrocortisona
Cortisona
Corticosterona
18-OH Deoxicorticosterona
Progesterona
17-B Estradiol
Testosterona
Aldosterona-lactona

Conociendo la correspondencia entre distintas cantidades de un esteroide, que en el sistema de radioinmunoensayo se interpreta como aldosterona y conociendo la cantidad en que dicho esteroide llega al sistema, una vez realizada la purificación, se puede calcular el factor de interferencia introducido en la medida por cada esteroide, modificando el sistema de purificación hasta que dicha interferencia sea despreciable.

En general, el método como se ha realizado el estudio de las reacciones cruzadas, consiste en secar en tubos de ensayo en triplicado, las cantidades indicadas del esteroide inerte a estudiar, que se llevan al sistema de radioinmunoensayo igual que las muestras problema en el procedimiento estandar. Los resultados obtenidos se leen de la curva estandar como cantidad de aldosterona, siendo ésta el equivalente en picogramos de aldosterona de la cantidad de esteroide utilizado.

En las Tablas (8 a 14) se ven los resultados de las reacciones cruzadas, obtenidas en los antisueros anti-aldosterona lactona de las series #137 y #138.

De la serie #137, se estudian antisueros obtenidos en tres distintos sangrados: (3-10-70), (3-24-70) y (6-4-70).

Los antisueros (3-10-70) y (3-24-70), se estudian con adición de γ -globulina, y en el (6-4-70) se compara el antisuero sin γ -globulina, y el cambio de su especificidad con la adición de γ -globulina.

Como puede verse en las Tablas, se produce un aumento considerable de la especificidad, probablemente por el efecto protector que la γ -globulina ejercería sobre el anticuerpo.

Los antisueros de la serie #138 estudiados son (4-21-70), (6-4-70) y (6-30-70). Todos con adición de γ -globulina.

En las Tablas (15-16) se ven los resultados del estudio de especificidad, realizado con el antisuero

antialdosterona 088 que es el utilizado en el método definitivo y que como se ha dicho antes, es una mezcla de dos sangrados distintos (11-26-69) y (1-5-70) ambos del mismo animal 088. Las reacciones cruzadas de este antisuero, fueron hechas con adición de globulina.

El procedimiento de incubación, separación de esteroide marcado libre, preparación de standards y concentración de γ -globulina, es el mismo que el descrito en el procedimiento standard definitivo.

Las diluciones usadas en cada antisuero, están indicadas en la columna correspondiente de la Tabla ().

La dilución usada en el estudio del antisuero 088 es 1:400.000, que es la utilizada en el método definitivo.

Como se ve en los resultados, aunque las reacciones cruzadas siguen una progresión de mayor interferencia a mayor cantidad de esteroide, no son absolutamente lineales. Este es en hecho observado ya por otros autores con antisueros específicos para otros esteroides como estrógenos (Longhope).

ANTISUERO 137 (3-10-70) Dil. 1:50.000 con γ Globulina

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reaccion cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>D-Aldosterona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	+5
	10 ng.	76
	100 ng.	> 400
<u>Cortisol</u>	100 pg.	2
	1 ng.	1
	10 ng.	3
	100 ng.	6
<u>Corticosterona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	4
	10 ng.	4
	100 ng.	13
<u>17-β Estradiol</u>	100 pg.	4
	1 ng.	0
	10 ng.	0
	100 ng.	0
<u>Testosterona</u>	100 pg.	6
	1 ng.	3
	10 ng.	6
	100 ng.	6
<u>18-OH B Lactona</u>	100 pg.	7
	1 ng.	13
	10 ng.	18
	100 ng.	~ 2:2

TABLA 8

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reaccion cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>18-OH DOCA Lactona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	35
	10 ng.	126
	100 ng.	> 400
<u>Corticosterona etioacido</u>	100 pg.	0
	1 ng.	1
	10 ng.	4
	100 ng.	5
<u>Cortisol etioacido</u>	100 pg.	1
	1 ng.	1
	10 ng.	5
	100 ng.	4
<u>Progesterona</u>	100 pg.	1
	1 ng.	4
	10 ng.	8
	100 ng.	29

TABLA 8 BIS.

Reacciones cruzadas Antisuero 137 (3-10-70) con
 γ Globulina. Dilución 1:50.000

ANTISUERO 137 (3-24-70) Dil. 1:25.000 con γ Globulina.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>D-Aldosterona</u>	100 pg.	5
	1 ng.	16
	10 ng.	128
	100 ng.	> 400
<u>Cortisol</u>	100 pg.	0
	1 ng.	2
	10 ng.	3
	100 ng.	6
<u>Corticosterona</u>	100 pg.	0
	1 ng.	0
	10 ng.	1
	100 ng.	10
<u>17-β Estradiol</u>	100 pg.	4
	1 ng.	0
	10 ng.	5
	100 ng.	1
<u>Testosterona</u>	100 pg.	6
	1 ng.	0
	10 ng.	6
	100 ng.	8
<u>18-OH B Lactona</u>	100 pg.	0
	1 ng.	7
	10 ng.	36
	100 ng.	184

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>18-OH DOCA Lactona</u>	100 pg.	1
	1 ng.	26
	10 ng.	129
	100 ng.	> 400
<u>Corticosterona etioacido</u>	100 pg.	0
	1 ng.	0
	10 ng.	0
	100 ng.	2
<u>Cortisol etioacido</u>	100 pg.	0
	1 ng.	0
	10 ng.	0
	100 ng.	0
<u>Progesterona</u>	100 pg.	3
	1 ng.	0
	10 ng.	2
	100 ng.	39

TABLA 9 BIS

Reacciones cruzadas Antisuero 137 (3-24-70).

Dilución 1:25.000 con γ Globulina.

ANTISUERO 137 (6-4-70) Dil. 1:20.000 sin y Globulina.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>D-Aldosterona</u>	100 pg.	35
	1 ng.	27
	10 ng.	58
	100 ng.	< 100 ng.
<u>Cortisol</u>	100 pg.	44
	1 ng.	7,5
	10 ng.	17
	100 ng.	37
<u>Corticosterona</u>	100 pg.	36,5
	1 ng.	7,5
	10 ng.	16,5
	100 ng.	31
<u>17-β Estradiol</u>	100 pg.	42
	1 ng.	12
	10 ng.	19
	100 ng.	32,5
<u>Testosterona</u>	100 pg.	69,5
	1 ng.	27
	10 ng.	95
	100 ng.	70
<u>18-OH B Lactona</u>	100 pg.	14,5
	1 ng.	15,5
	10 ng.	45,5
	100 ng.	150

TABLA 10

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>18-OH DOCA Lactona</u>	100 pg.	25,5
	1 ng.	34
	10 ng.	99,5
	100 ng.	< 100 ng.
<u>Corticosterona etioacido</u>	100 pg.	6
	1 ng.	2
	10 ng.	9,5
	100 ng.	23,5
<u>Cortisol etioacido</u>	100 pg.	9,5
	1 ng.	8
	10 ng.	5
	100 ng.	23
<u>Progesterona</u>	100 pg.	53
	1 ng.	7,5
	10 ng.	36,7
	100 ng.	112

TABLA 10 BIS

Reacciones cruzadas Antisuero 137 (6-4-70) sin
y Globulina. Dilución 1:20.000

ANTISUERO 137 (6-4-70) Dil. 1:20.000 con y Globulina.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>D-Aldosterona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	17
	10 ng.	66
	100 ng.	>300 <100 ng.
<u>Cortisol</u>	100 pg.	8
	1 ng.	1
	10 ng.	3
	100 ng.	12
<u>Corticosterona</u>	100 pg.	5
	1 ng.	1
	10 ng.	5
	100 ng.	11
<u>17-β Estradiol</u>	100 pg.	4
	1 ng.	0
	10 ng.	2
	100 ng.	7
<u>Testosterona</u>	100 pg.	14
	1 ng.	0
	10 ng.	7
	100 ng.	20
<u>18-OH B Lactona</u>	100 pg.	7
	1 ng.	15
	10 ng.	38
	100 ng.	167

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>18-OH DOCA Lactona</u>	100 pg.	14
	1 ng.	54
	10 ng.	170
	100 ng.	>300 <100 ng.
<u>Corticosterona etioacido</u>	100 pg.	2
	1 ng.	0
	10 ng.	2
	100 ng.	7
<u>Cortisol etioacido</u>	100 pg.	4
	1 ng.	3
	10 ng.	6
	100 ng.	8
<u>Progesterona</u>	100 pg.	1
	1 ng.	2
	10 ng.	10
	100 ng.	62

TABLA 11 BIS

Reacciones cruzadas Antisuero 137 (6-4-70) con
adición de γ Globulina. Dilución 1:20.000.

ANTISUERO 138 (4-21-70) Dil. 1:75.000 con Y Globulina.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>D-Aldosterona</u>	100 pg.	8
	1 ng.	20
	10 ng.	52
	100 ng.	>400
<u>Cortisol</u>	100 pg.	6
	1 ng.	2
	10 ng.	1
	100 ng.	6
<u>Corticosterona</u>	100 pg.	9
	1 ng.	2
	10 ng.	2
	100 ng.	9
<u>17-β Estradiol</u>	100 pg.	8
	1 ng.	2
	10 ng.	4
	100 ng.	9
<u>Testosterona</u>	100 pg.	12
	1 ng.	6
	10 ng.	19
	100 ng.	33
① <u>18-OH B Lactona</u>	100 pg.	2
	1 ng.	4
	10 ng.	13
	100 ng.	59

TABLA 12

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>18-OH DOCA Lactona</u>	100 pg.	3
	1 ng.	20
	10 ng.	59
	100 ng.	~372
<u>Corticosterona etioacido</u>	100 pg.	0
	1 ng.	1
	10 ng.	4
	100 ng.	3
<u>Cortisol etioacido</u>	100 pg.	2
	1 ng.	5
	10 ng.	1
	100 ng.	6
<u>Progesterona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	5
	10 ng.	22
	100 ng.	46

TABLA 12 BIS

Reacciones cruzadas Antisuero 138 (4-21-70).

Dilución de 1:75.000 con adición de γ Globulina.

ANTISUERO 138 (6-4-70) Dilución 1:75.000 con y Globulina.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>D-Aldosterona</u>	100 pg.	12
	1 ng.	19
	10 ng.	38
	100 ng.	>200 <1000
<u>Cortisol</u>	100 pg.	13
	1 ng.	3
	10 ng.	9
	100 ng.	12
<u>Corticosterona</u>	100 pg.	21
	1 ng.	3
	10 ng.	4
	100 ng.	8
<u>17-β Estradiol</u>	100 pg.	15
	1 ng.	10
	10 ng.	13
	100 ng.	12
<u>Testosterona</u>	100 pg.	7
	1 ng.	7
	10 ng.	21
	100 ng.	41
<u>18-OH B Lactona</u>	100 pg.	9
	1 ng.	12
	10 ng.	30
	100 ng.	89

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>18-OH DOCA Lactona</u>	100 pg.	12
	1 ng.	27
	10 ng.	80
	100 ng.	~303
<u>Corticosterona etioacido</u>	100 pg.	6
	1 ng.	10
	10 ng.	11
	100 ng.	11
<u>Cortisol etioacido</u>	100 pg.	10
	1 ng.	11
	10 ng.	10
	100 ng.	10
<u>Progesterona</u>	100 pg.	11
	1 ng.	14
	10 ng.	22
	100 ng.	41

TABLA 13 BIS

Reacciones cruzadas Antisuero 138 (6-4-70).

Dilución 1:75.000 con adición de γ Globulina.

ANTISUERO 138 (6-30-70). Dilución 1:75.000 con γ Globulina.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>D-Aldosterona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	26
	10 ng.	36
	100 ng.	300 1000
<u>Cortisol</u>	100 pg.	7
	1 ng.	0
	10 ng.	0
	100 ng.	2
<u>Corticosterona</u>	100 pg.	5
	1 ng.	0
	10 ng.	0
	100 ng.	10
<u>17-β Estradiol</u>	100 pg.	4
	1 ng.	2
	10 ng.	6
	100 ng.	18
<u>Testosterona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	3
	10 ng.	13
	100 ng.	29
<u>18-OH B Lactona</u>	100 pg.	2
	1 ng.	1
	10 ng.	22
	100 ng.	55

TABLA 14

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>18-OH DOCA Lactona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	20
	10 ng.	54
	100 ng.	300
<u>Corticosterona etioacido</u>	100 pg.	0
	1 ng.	0
	10 ng.	0
	100 ng.	3
<u>Cortisol etioacido</u>	100 pg.	3
	1 ng.	2
	10 ng.	2
	100 ng.	0
<u>Progesterona</u>	100 pg.	4
	1 ng.	0
	10 ng.	12
	100 ng.	26

TABLA 14 BIS

Reacciones cruzadas Antisuero 138 (6-30-70).

Dilución 1:75.000 con adición de γ Globulina.

ANTISUERO 088. Dilución 1:400.000 con γ Globulina.

<u>ESTEROCIDE</u>	<u>Cantidad añadida μg.</u>	<u>Reacción cruzada expr. en μg. Aldo.</u>
<u>Cortisol</u>	100	4
	1000	4
	10.000	13
	100.000	33
<u>Corticosterona</u>	100	8
	1000	0
	10.000	8
	100.000	110
<u>Progesterona</u>	100	6
	1000	8
	10.000	59
	100.000	240
<u>Testosterona</u>	100	13
	1000	8
	10.000	75
	100.000	280
<u>Cortisona</u>	100	0
	1000	4
	10.000	56
	100.000	270
<u>18-OH DOCA</u>	100	2
	1000	6
	10.000	30
	100.000	126

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad añadida pg.</u>	<u>Reacción cruzada expr. en pg. Aldo.</u>
<u>17-β Estradiol</u>	100	6
	1000	0
	10.000	2
	100.000	6
<u>Aldosterona-γ Lactona</u>	100	24
	1000	114
	10.000	400
	100.000	100.000

TABLA 15-BIS

Reacciones cruzadas Antisuero 088. Dilución
1:400.000 con γ Globulina.

ANTISUERO 088. Dilución 1:400.000 con γ Globulina.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad esteroide pg.</u>	<u>Reacción cruzada expr. en %</u>
<u>Cortisol</u>	100	4 %
	1000	0,4 %
	10.000	0,13 %
	100.000	0,03 %
<u>Corticosterona</u>	100	8 %
	1000	0 %
	10.000	0,8 %
	100.000	0,11 %
<u>Progesterona</u>	100	6 %
	1000	0,8 %
	10.000	0,58 %
	100.000	0,24 %
<u>Testosterona</u>	100	13 %
	1000	0,8 %
	10.000	0,75 %
	100.000	0,28 %
<u>Cortisona</u>	100	0 %
	1000	0,4 %
	10.000	0,56 %
	100.000	0,27 %
<u>18-OH DOCA</u>	100	2 %
	1000	0,6 %
	10.000	0,3 %
	100.000	0,27 %

ANTISUERO 088. Dilución 1:400.000 con γ Globulina.

<u>ESTEROIDE</u>	<u>Cantidad esteroide pg.</u>	<u>Reacción cruzada expr. en %</u>
<u>17-β Estradiol</u>	100	6 %
	1000	0 %
	10.000	0,2 %
	100.000	0,006%
<u>Aldosterona- Lactona</u>	100	24 %
	1000	11,4 %
	10.000	4 %
	100.000	100 %

TABLA 16 BIS

Reacciones cruzadas Antisuero 088. Dilución
1:400.000 con γ Globulina. La reacción cruzada
está expresada como porcentaje de la cantidad
de esteroide añadido.

A-3 Estudio de métodos de purificación.a - Extracción

Todos los estudios de las condiciones de extracción se realizaron utilizando CH_2Cl_2 para la extracción de aldosterona del espécimen de plasma.

i - Relación de volumen CH_2Cl_2 /plasma

Se determinó la cantidad mínima de CH_2Cl_2 utilizable para una máxima extracción de aldosterona.

Utilizando aldosterona titulada para medir las pérdidas, se compararon las siguientes condiciones:

1) Extracción del plasma con 5 volúmenes de CH_2Cl_2 en embudos de separación por agitación durante dos minutos, repitiendo la extracción dos veces. Con esta técnica, la aldosterona marcada no extraída del plasma fué una media de 1,95% de la aldosterona original.

2) Extracción del plasma con 4 volúmenes de CH_2Cl_2 en tubos con tapón por agitación violenta durante dos minutos. Se vió que realizando una sola extracción por este método, la pérdida media de aldosterona era de 1,99% (6 determinaciones) de la cantidad original, similar a la observada con el método anterior, por lo que en el método definitivo se utilizó este tipo de extracción, igual de eficaz y much más sencillo.

ii - Lavado de CH₂Cl₂

Una vez realizada la extracción, el CH₂Cl₂ es lavado con 1/7 de su volumen de 0.1 N NaOH. Con este volumen, la pérdida de aldosterona es 1.30% de la cantidad original. El CH₂Cl₂ es lavado nuevamente con igual volumen de H₂O que el utilizado de NaOH, produciéndose una pérdida media de 0,69%.

b - Partición

En el estudio del método de purificación, se vió la necesidad de una etapa de purificación previa a la cromatografía, con objeto de eliminar del espécimen sustancias grasas que producían resultados erráticos en el desarrollo cromatográfico, alterando la movilidad del espécimen y facilitando su dispersión, según la concentración de lípidos presente.

i - Comparación de distintos métodos de partición.

Se extrajeron 10 ml. de un pool plasmático, con 50 ml. de CH₂Cl₂ x 2 en triplicado (A,B,C).

Una vez separada la fracción plasmática, se disolvió en el CH₂Cl₂ 1-2 H³ aldosterona (1250 c.p.m.).

El CH₂Cl₂ fué entonces lavado con 0,1 N NaOH (10 ml.) y H₂O (10 ml.).

Una vez secado el CH₂Cl₂ en rotor de vacío, el esteroide fué transferido a tubos de partición y secado con flujo de N₂.

Los tres especímenes se disolvieron en 3 ml. 20% Etanol.

A - Adición de 10 ml. de Eter de petróleo.

Agitación 1 minuto. Centrifugación. Se midió radioactividad de 5 ml. de la fase Eter de petróleo.

B - Adición de 10 ml. de Benceno. Partición como A. Se determinó radioactividad de 5 ml de fase Benceno.

C - Igual que espécimen A, pero repitiendo la partición una segunda vez con Eter de petróleo. Se midió la radioactividad de 5 ml. de la fase Eter Petróleo de la segunda partición.

Los resultados están expresados en Tabla (17).

Como se infiere de los resultados, el sistema 20% etanol:benceno independientemente de su capacidad extractora de lípidos, no es utilizable, y que una elevada fracción de aldosterona se transfiere a la fase benceno, perdiéndose más de un 6

Las pérdidas de aldosterona en el sistema de partición 20% etanol:éter-petróleo en este experimento, fueron de 7,70%. Repitiendo la medición de pérdidas en la fase éter benceno, en 10 sucesivas determinaciones se encontró un valor medio de 3.5% de pérdida de aldosterona.

Cromatografiando los especímenes una vez realizadas las diferentes particiones, se observó que el espécimen purificado en el sistema 20%

	<u>Tiempo Conteo</u>	<u>Conteos Totales</u>	<u>c.p.m. corr. BKG</u>	<u>% del control</u>
B.K.G.	400	7896	19.74	
Control 1	400	480617	1181.80	} 1185.19 = 100%
Control 2	400	483333	1188.59	
A-5 ml Eter Petr. 1° partición	400	26150	45.63	$3.85 \times 2 = 7.70\%$
C-5 ml Eter Petr. 2° partición	400	9332	3.59	$0.30 \times 2 = 0.60\%$
B-5 ml Benceno 1° partición	395.43	154261	370.36	$31.24 \times 2 = 62.49\%$

TABLA 17

Pérdidas en los sistemas de partición
 10% Etanol:Eter de Petroleo y
 20% Etanol:Benceno.

etanol:benceno, producía marca visible en el cromatograma desde punto de aplicación hasta el frente del solvente.

Los especímenes B y C no produjeron ninguna marca en el cromatograma, eliminándose el efecto de dispersión. Una segunda partición con el sistema 20% Etanol:Eter-Petróleo se consideró innecesaria, ya que solo produce mayores pérdidas sin mejorar la purificación del espécimen apreciablemente.

c - Estudio de sistemas cromatográficos.

i - Sistemas cromatográficos.

En el primitivo método proyectado utilizando anticuerpos antilactona, había que utilizar dos sistemas cromatográficos.

El primero era utilizado después de la extracción y partición y consistía en placas de celite preimpregnadas con Formamida (solución acetona-formamida al 15%) y desarrolladas en el sistema agua-butilacetato (5-100), saturado con formamida.

El segundo sistema cromatográfico en el procedimiento primitivo, era utilizado después de la lactonización de la muestra y consistía en placas de Silica Gel F. desarrolladas en 6% de Etanol en benceno.

Como ya hemos dicho, el sistema de aldosterona lactona se abandonó por el sistema utilizando

antisuero antialdosterona.

Desde un principio se intentó utilizar un solo sistema cromatográfico que produjese una separación satisfactoria entre aldosterona y demás esteroides naturales y que además no contaminase la muestra produciendo blancos de reactivo elevados.

Desde un principio se intentó utilizar celite como soporte cromatográfico, ya que los sistemas estudiados utilizando silica gel F daban blancos elevados.

Utilizando celite G. como soporte, se estudiaron 54 sistemas distintos, hasta encontrar finalmente dos que tenían las características de producir bajos blancos de reagente y suficiente separación de esteroides.

El primer sistema utilizado, consistía en:

A) Placas de celite (20 x 20 cm.) de 375 mm. de espesor preimpregnadas en acetona Propilenglicol (95:5) y con dos desarrollos en Tolueno- CH_2Cl_2 (90-10), saturado con propilenglicol.

Este sistema produce blancos reagentes muy satisfactorios y una separación adecuada de los distintos esteroides, con el único inconveniente de que utilizando celite de distinto número de serie, se producen cambios en la separación de cortisona y aldosterona, obligando a recromatografiar en algunos casos.

El sistema finalmente utilizado en el método estandar, consiste en:

B) Placas de Celite G (20 x 20 cm.) de un espesor de 375 mm. activadas y almacenadas en armario desecador hasta su uso.

Las placas son preimpregnadas con etilenglicol propilenglicol predesarrollándolas en acetona: etilenglicol:propilenglicol (89:6:5).

Conviene aplicar las muestras durante los treinta minutos después de la impregnación. Las muestras se aplican en puntos únicos con acetona:diclorometano (1:1) y se aplican marcadores a cada lado de la placa.

Las placas se desarrollan dos veces en Tolueno diclorometano:acetona (80:15:5) saturado con etilenglicol:propilenglicol (3:1).

El segundo desarrollo conviene hacerlo tan pronto como se ha evaporado el solvente del primero (aproximadamente 9 minutos).

A continuación describimos diversos experimentos realizados para determinar las características de cada sistema cromatográfico.

También se describen estudios realizados en sistemas de purificación por cromatografía en columna de sílica gel.

ii - Separación de Aldosterona y Cortisol y pérdidas de Aldosterona en diversos sistemas cromatográficos.

A continuación describimos algunos experimentos realizados en varios sistemas cromatográficos

como un ejemplo de la sistemática seguida en el estudio de los diversos sistemas analizados.

Comparamos los sistemas siguientes:

1) Celite preimpregnada en 5% Propilenglicol:Acetona

2) " " " 6% " "

3) " " " 7% " "

1, 2 y 3 desarrollados en el sistema:

Tolueno: CHCl_3 (90:10) saturado con Propilenglicol.

4) Celite preimpregnada en 5% Propilenglicol: Acetona y desarrollado en el sistema:

Tolueno:Diclorometano (90:10) saturado con Propilenglicol.

Las muestras aplicadas en cada placa consistían en:

A: $1\text{-}2\text{-H}^3$ Aldosterona 560 pg en cuadruplicado.

B: Cortisol inerte 5 g.

$1\text{-}2\text{-H}^3$ Cortisol 2.151 pg=166.600 c.p.m.

$1\text{-}2\text{-H}^3$ Aldosterona 500 pg.

Tubos B también en cuadruplicado.

Una vez los tubos secos, se aplicaron utilizando CH_2Cl_2 :Acetona (1:1), uno del grupo A y uno del grupo B en cada placa por separado y también controles de Aldosterona, Cortisol y Cortisona, desarrollándose la placa según el sistema correspondiente.

Los valores R_F para cada sistema cromatográfico están descritos en la Tabla (18).

<u>Sistema</u>	<u>Aldosterona</u>	<u>Cortisona</u>	<u>Cortisol</u>
1	0.45	0.37	0.17
2	0.41	0.33	0.15
3	0.37	0.27	0.11
4	0.47	0.37	0.16

TABLA 18

Valores R_F de distintos esteroides en sistemas cromatográficos 1-4.

En la Tabla (19) se describen los resultados obtenidos en la medición de porcentaje de Aldosterona o Cortisol eluido del area correspondiente a Aldosterona en los cuatro sistemas cromatográficos.

Comparando de este modo diversos sistemas, se estudian así sus valores R_F para distintos esteroides, la interferencia de cortisol en el area de aldosterona y las pérdidas de aldosterona en el sistema.

Como ya hemos dicho, se estudiaron de este modo 54 sistemas, variando el sistema de impregnación y de desarrollo hasta llegar a los dos sistemas descritos como A y B.

iii - Comparación de uno o dos desarrollos en el sistema A.

Este estudio se hizo aplicando en placas de celite A y B duplicados de especimenes compuestos de 26.2 pg. de $1-2 H^3$ Aldosterona. Antes de la aplicación, las placas fueron preimpregnadas en 5% Propilenglicol en acetona. La placa A fué desarrollada dos veces en el sistema Tolueno- CH_2Cl_2 (90:10), saturado con propilenglicol. Placa B desarrollada en el mismo sistema solo una vez.

Los valores R_F de los standards, aplicados en los laterales de la placa y visualizados con azul de Tetrazolium, están indicados en la Tabla (20).

	<u>Tiempo Conteo</u>	<u>Conteos Totales</u>	<u>C.p.m. corr. BKG</u>	
BKG	10	184	18.4	
Control H ³ Cortisol	5.11 5.17	900.000 900.000	174062 176166	> 175084 = 100% B
Control H ³ Aldosterona	10 10	448853 451388	44866.4 45120.4	> 44994 = 100% A
1-A	10	316418	31623.4	70.28% Aldoster
1-B	10	7125	694.1	0.39% Cortisol
2-A	10	292844	29276	65.04% Aldoster
2-B	10	8892	870.8	0.49% Cortisol
3-A	10	321043	32085.9	71.31% Aldoster
3-B	10	7314	713	0.40% Cortisol
4-A	10	313953	31376.0	69.73% Aldoster
4-B	10	7549	736.5	0.42% Cortisol

TABLA 19

Interferencia de cortisol y pérdidas de aldosterona
en sistemas cromatográficos 1-4.

	Cortisol	Cortisona	Aldosterona
R _F Un desarrollo	0.10	0.22	0.32
R _F Dos desarrollos	0.18	0.39	0.52

TABLA 20

Este aumento del valor R_F para distintos esteroides con mayor diferencia entre ellos, o sea con mayor separación utilizando dos desarrollos, fué observado en casi todos los sistemas en que se utilizó propilenglicol o etilenglicol como fase inerte.

En el sistema B, que es el definitivamente utilizado en el método, un solo desarrollo producía unos valores R_F muy pequeños con poca movilidad de Aldosterona, Cortisol y Cortisona.

Eluyendo el area correspondiente a Aldosterona con CH₂Cl₂, saturado con agua el % de aldosterona recobrada fué:

- 1 desarrollo 81% de Aldosterona recobrada
- 2 desarrollos 85% de Aldosterona recobrada

Es evidente que no hay cambio apreciable en las pérdidas de aldosterona en el sistema cromatográfico con uno o dos desarrollos, siendo ésto válido también para el sistema B.

iv - Dispersión de Aldosterona en sistema cromatográfico A.

Con objeto de determinar las pérdidas de aldosterona en el sistema cromatográfico, producidas

por dispersión durante la emigración del esteroide, se cromatografió aldosterona tritiada y se midió la radioactividad en distintos segmentos de la placa cromatográfica.

Una vez eluidas las distintas porciones de celite con CH_2Cl_2 y acetona, se midió su radioactividad calculandose así el porcentaje de aldosterona presente.

En la figura (7) se esquematiza la placa cromatográfica y el porcentaje de aldosterona marcada, encontrada en las distintas areas eluidas.

v - Dispersión de Aldosterona en el sistema cromatográfico B.

La metodología utilizada fué la misma que en el experimento descrito anteriormente en el estudio de dispersión en el sistema A.

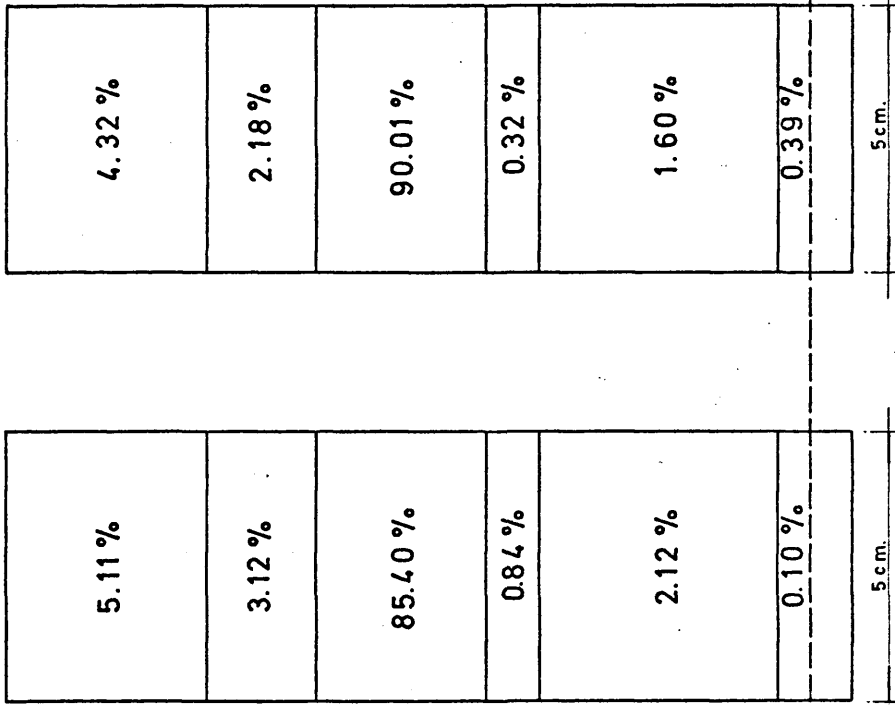
En la figura (7) se esquematiza la placa cromatográfica y el % de aldosterona tritiada encontrada en las distintas areas eluidas.

vi - Separación de esteroides en sistema cromatográfico A

Se han medido los valores de separación de diversos esteroides en este sistema, aplicando los esteroides inertes por separado y mezclados en una aplicación única. El desplazamiento de los esteroides en el sistema cromatografiados por separado o mezclados, fué el mismo.

Una vez desarrollada la placa cromatográfica, se visualizaron los esteroides por nebulización con

cm. 15- 14- 13- 12- 11- 10- 9- 8- 7- 6- 5- 4- 3- 2- 1- 0



ORIGEN

FIG. 7

azul de Tetrazolium con solución Porter-Silber y ligero calentamiento.

Una vez medida la distancia entre el punto de aplicación y el centro de la zona en que se visualizó el esteroide correspondiente (D.E.), se calculó el valor R_F dividiendo esta distancia por la distancia total recorrida por el frente solvente (D.S.).

$$R_F = \frac{D.E.}{D.S.}$$

Los valores obtenidos fueron los siguientes:

<u>Esteroides</u>	<u>R_F</u>
18-OH Corticosterona	0.10
Cortisol	0.31
Aldosterona	0.52
Cortisona	0.62
18-OH Desoxicorticosterona	0.88

En sucesivas mediciones de los valores R_F en este sistema, se vió que eran constantes para todos los esteroides, excepto para cortisona, cuyo R_F variaba al utilizar celite de distinta fecha de fabricación, produciéndose a veces una mezcla parcial de aldosterona y cortisona, en cuyo caso había que desechar dicho espécimen o recromatografiarlo para obtener separación de los dos esteroides.

Por ello y para evitar esta interferencia intermitente, se intentó desarrollar un nuevo sistema cromatográfico en que se pudieran separar los distintos esteroides, en un modo totalmente

reproducibile, sin verse alterada dicha separación por el inevitable cambio en número de serie de celite utilizado.

vii - Separación de Esteroides en sistema cromatográfico B.

En el estudio de separación de diversos esteroides en este sistema cromatográfico, se utilizó la misma metodología que en el estudio del sistema A descrito anteriormente.

Los valores de separación se expresan en $R_{\text{cortico}}/\text{cortico}$, o sea el cociente de dividir la distancia desde el centro de la zona de emigración del esteroide correspondiente al origen de aplicación por la distancia de emigración de corticosterona.

Los valores están indicados en Tabla (21),

Estos valores se calcularon en 20 placas cromatográficas, utilizando diez envases distintos de celite en su preparación, siendo la separación encontrada igual en todas las repeticiones, con iguales valores R_F para los distintos esteroides.

viii - Determinación de la interferencia producida por Cortisol y Cortisona en el sistema cromatográfico B.

Aunque en un sistema cromatográfico, se establezca una suficiente separación entre dos esteroides con un R_F distinto, existe la posibilidad de que en el area correspondiente a uno de ellos llegue o permanezca una mínima cantidad del otro,

	Rcorticosterona
18 OH Corticosterona	0.10
Cortisol	0.34
Aldosterona	0.55
Cortisona	0.66
18 OH Deoxicorticosterona	0.86
Corticosterona	1.00
Deoxicorticosterona	1.10

TABLA 21

Separación de distintos esteroides
en el sistema cromatográfico B.

sobre todo cuando los esteroides separados están en muy distinta proporción, como ocurre en el caso de la aldosterona en el sistema cromatográfico que estudiamos, en que aunque los valores R_F en el sistema son ampliamente distintos para cortisol y cortisona, que el R_F de aldosterona, dada la gran diferencia de masa esteroidea a cromatografiar entre ellos, siempre habrá, utilizando una sola cromatografía, determinada cantidad de cortisona y cortisol en el área a eluir correspondiente a la aldosterona. El presente estudio se realizó para determinar si esta cantidad, una vez tenidas en cuenta las reacciones cruzadas, interfería o no en la medición de aldosterona.

Los esteroides utilizados, aldosterona, cortisol y cortisona y $1-2 \text{ H}^3$ aldosterona, $1-2 \text{ H}^3$ cortisol y $1-2 \text{ H}^3$ cortisona, fueron purificados antes de su uso en el mismo sistema cromatográfico que el estudiado y posteriormente se cuantificaron los esteroides marcados mediante conteo de partes alicuotas y los inertes por absorción ultravioleta.

El sistema cromatográfico estudiado, es el utilizado en el procedimiento estandar, placas de celite pre-desarrolladas en Acetona 89 Propilenglicol 5 y Etilenglicol 6 y desarrolladas x 2 en Tolueno 80 CH_2Cl_2 15 y Acetona 5, saturado con Propilenglicol-Etilenglicol (1:3).

Se cromatografió una mezcla de los esteroides inertes aldosterona, cortisol y corticosterona, en cantidad correspondiente a la que llegaría a

cromatografía en el procedimiento normal de purificación. Se utilizaron tres placas de cromatografía, denominadas H^3A-H^3F y H^3E , y en cada una se aplicó en triplicado la mezcla de esteroides inertes con el esteroide marcado correspondiente. A cada lado de las placas, se aplicaron estándares de los tres esteroides que luego se visualizaron con A.T.Z.

Las muestras aplicadas en triplicado y correspondientes a cada cromatoplaque, fueron las siguientes:

Placa H^3A

1-2- H^3 Aldosterona: 2580 c.p.m.

Cortisona : 100 ng.

Cortisol : 800 ng.

Placa H^3F

1-2- H^3 Cortisol: 13200 c.p.m.

Esteroides inertes igual que placa H^3A .

Placa H^3E

1-2- H^3 Cortisona: 7500 c.p.m.

Esteroides inertes igual que placa H^3A .

Una vez desarrolladas las placas e identificados los estándares, se eluyeron las áreas correspondientes a aldosterona en las tres muestras de cada una de las tres cromatoplaque y se contó su radioactividad.

En la Tabla (22) están indicados los resultados, expresándose la cantidad de cortisol y cortisona encontrada en el área de aldosterona, como porcentaje del total aplicado en el origen.

	Tiempo Conteo	Conteos Totales	C.P.M. corr.. BKG	% Recobrado	Media Recobrada
BKG	50	1023	20.46		
<u>Placa H³ Aldo.</u>					
Total H ³ Aldo.	3.87	10000	2564	2584	
Total H ³ Aldo.	3.81	10000	2604		% Aldosterona
Area Aldo. a	4.04	10000	2454	95%	en Aldo. area
b	4.10	10000	2419	93.6%	93.3%
c	4.20	10000	2360	91.3%	
<u>Placa H³ Cortisol</u>					
Total H ³ Cortisol	15.13	200000	13198	13202	
Total H ³ Cortisol	15.12	200000	13207		% Cortisol
Area Aldo. a	50	1506	10	0.07%	en Aldo. area
b	50	1967	19	0.14%	0.10%
c	50	1556	11	0.08%	

TABLA 22

Interferencia de Cortisol y Cortisona en sistema
Cromatográfico B.

<u>Placa H³ Cortisona</u>	<u>Tiempo Conteo</u>	<u>Conteos Totales</u>	<u>C.p.m. corr. BKG</u>	<u>% Recobrado</u>	<u>Media Recobrada</u>
Total H ³ Cortisona	1.33	10000	7498	7498	
Total H ³ Cortisona	1.33	10000	7498		% Cortisona
Area Aldo. a	47.13	10000	192	2.56	en Aldo. area
b	37.80	10000	244	3.25	2.88%
c	47.62	10000	190	2.83	

TABLA 22 BIS

Interferencia de Cortisol y Cortisona en sistema Cromatográfico B.

Calculando la cantidad de cortisol o cortisona en una muestra que, después de extracciones y partes alicuotas, llega a la cromatografía y el porcentaje que se recoge en el area correspondiente a la aldosterona y considerando la reacción cruzada correspondiente, osea la equivalencia de esta cantidad que es medida en el sistema como aldosterona, se comprueba que este sistema de separación es totalmente satisfactorio, dando niveles de interferencia despreciables.

ix - Interferencia producida por Cortisol en el sistema cromatográfico A.

La determinación de dicha interferencia, osea la masa de cortisol que es acumulada en el area correspondiente a aldosterona, se realizó de manera semejante al estudio descrito anteriormente para el sistema cromatográfico B, aunque en este experimento se realizó con especímenes completos con posterior extracción y partición antes de realizar la cromatografía.

Cada espécimen consistió en 10 ml. de un pool de plasma, con una concentración de cortisol de 7,4 g/100 ml., añadiéndose a cada espécimen 1 g. de cortisol inerte y 4,3 ng. de 1-2-H³ cortisol purificado. El motivo de añadir cortisol inerte a la muestra, es el simular alta concentración de cortisol, para que la interferencia en el sistema cromatográfico sea real con una gran masa de cortisol arrastrando en el desarrollo cromatográfico el porcentaje correspondiente de cortisol

tritiado hasta el area de aldosterona. Una vez preparados los especimenes se realizó la extracción y partición según el método standard, siendo cromatografiados en el sistema A. Una vez identificada y eluida el area de aldosterona, se midió su radioactividad, correspondiente a 1-2- H^3 cortisol, calculando así el porcentaje del cortisol tritiado añadido inicialmente. Los resultados están descritos en la Tabla (23).

El porcentaje de cortisol que se recoge en el area correspondiente a aldosterona, es mayor que el obtenido en el sistema B, que por tanto es superior en su capacidad aisladora de aldosterona.

x - Estudios de purificación de Aldosterona por cromatografía en columna de Silica Gel 8 x 30 mm.

Se estudió la posibilidad de utilizar columnas de silica gel como método de aislamiento de aldosterona previamente al radioinmunoensayo.

Como estudio previo antes de verificar la purificación real de aldosterona en el sistema, se midieron las pérdidas producidas.

Se utilizaron columnas de 8 x 30 mm. de Silica Gel (mesh 28-200). Las columnas fueron prelavadas con 2 ml. de CH_2Cl_2 .

Los especimenes consistieron en 1120 pg. de 1-2 H^3 aldosterona, disueltos en 50 ml. de CH_2Cl_2 que se dejaron caer libremente por la columna, recogiénolos y una vez secados en vacío, transferido el esteroide marcado a vial de conteo y

	<u>Tiempo Conteo</u>	<u>Conteos Totales</u>	<u>c.p.m. corr. BKG</u>	<u>% de Cortisol en Aldo. area</u>
BKG	50	1067	21.34	
Control 1	13.40	900.000	67142.83	
				66673.32 = 100%
Control 2	13.59	900.000	66203.80	
Aldo. Area 1	2	1032	494.60	= 0.7419%
Aldo. Area 2	2	1367	662.16	= 0.9931%

TABLA 23

Interferencia de Cortisol en el sistema
cromatográfico A.

medida su radioactividad. (Duplicados A-1, A-2).

Las columnas fueron eluidas a continuación con 5 ml. de una disolución de CH_2Cl_2 :metanol (100:7), recogidos y medida su radioactividad (Duplicados B-1, B-2).

Las columnas fueron eluidas finalmente con 5 ml. de una disolución CH_2Cl_2 :acetona (7:4), recogidos y medida su radioactividad (Duplicados C-1, C-2).

Los resultados están indicados en la Tabla (24) donde se expresa la media de duplicados.

	<u>% de H^3 Aldosterona</u>
50 ml. CH_2Cl_2 recogido - A	0.045%
5 ml. CH_2Cl_2 -Metanol - B	28.5 %
5 ml. CH_2Cl_2 -Acetona - C	8.79 %

TABLA 24

Los resultados indican que la columna de sílica gel adsorbe la aldosterona del disolvente CH_2Cl_2 pero que la reextracción con CH_2Cl_2 :metanol, produce unas pérdidas excesivas con una recogida mínima y que eluyendo con un solvente más como acetona, tampoco produce recogida significativa de la aldosterona.

xi - Cromatografía en columnas de Sílica Gen activada
8 x 60 mm.

Se estudió otro sistema de columna, utilizando columnas de mayor longitud (60 mm.) a igual diámetro (3 mm.) de Sílica Gel activada a 135° durante dos horas.

La metodología seguida fué semejante a la del experimento anterior, disolviendo el espécimen en 100 ml. de CH_2Cl_2 , dejando fluir el espécimen a través de la columna por gravedad.

Las sucesivas eluciones de las columnas, se realizaron sucesivamente con 10 ml. de acetona: CH_2Cl_2 (1:1) (A-1) (A-2) y con 10 ml. de CH_2Cl_2 : metanol (1:1) (B-1) (B-2).

Paralelamente, se realizó el mismo experimento, también en duplicado, con columnas de sílica gel no activada. (C-1, C-2) (D-1, D-2).

La medida de duplicados de los porcentajes de aldosterona recobrada en cada elución, están expresados en la Tabla (25).

	<u>% de H^3 Aldosterona</u>
<u>Silica Gel Activada</u>	
Acetona: CH_2Cl_2 - A	22.14%
Metanol: CH_2Cl_2 - B	43.13%
<u>Silica Gel no activada</u>	
Acetona: CH_2Cl_2 - C	11.32%
Metanol: CH_2Cl_2 - D	26.21%

TABLA 25

Los resultados obtenidos con Silica Gel activada en cuanto a pérdidas de aldosterona, son superiores a los obtenidos en columnas sin activación previa, siendo superior la elución con metanol que con acetona, pero aún así, las pérdidas son superiores al 50%, por lo que se decidió no proseguir con el estudio

de purificación por columna y adoptar el sistema de purificación por cromatografía en capa fina.

A-4 Protocolo Definitivo del método.a - Reagentes y Disoluciones.

Los reactivos, la aldosterona inerte y 1-2 H³ aldosterona, son los descritos en página en la descripción general de materiales, al igual que las disoluciones de conteo, de azul de Tetrazolium y la solución equilibradora de fosfato, placas de celite.

A continuación se describen las disoluciones específicas utilizadas en el método estándar definitivo.

Diluciones de aldosterona inerte.

Una vez cuantificada (pág.) la aldosterona purificada, se almacena en una dilución en 50% etanol acuoso con una concentración de 10 mg/ml.

No conviene almacenar aldosterona en disolución en etanol absoluto, ya que se forma un derivado hemiacetal con distinta movilidad cromatográfica.

A partir de la dilución de almacenamiento, se hacen diluciones de trabajo también en 50% etanol.

200 pg/ml - 0.1 ml = 20 pg

500 pg/ml - 0.1 ml = 50 pg

1 ng/ml - 0.1 ml = 100 pg

- 0.2 ml = 200 pg

Todas las diluciones son conservadas a -12°.

Diluciones de 1-2-H³ Aldosterona

Una vez purificada y cuantificada según descrito en página (50), se hace una dilución con 50% etanol acuoso de 16.37 g/ml. (1.56×10^6 cpm/ml) para usar en la preparación de la disolución de anti-suero-H³-aldosterona y buffer-fosfato-H³-aldosterona.

Se prepara otra dilución con 50% etanol acuoso de 131 pg/ml (12596 cpm/ml), que se utilizará para la medición de las pérdidas en especímenes individuales, a lo largo del proceso de purificación.

Vidrio

Todo el material de vidrio utilizado, es lavado con solución caliente de detergente, aclarado con agua x 10 agua destilada x 5 y etanol x 5.

Las pipetas de vidrio son lavadas con solución lavadora de ácido sulfúrico-dicromato antes de ser aclaradas.

Las micropipetas utilizadas para la aplicación en las placas cromatográficas, son lavadas en detergente y aclaradas en corrientes sucesivas de acetona, metanol y cloroformo.

La preparación de las microcolumnas utilizadas para la elución de la aldosterona adsorbida en celite, ha sido descritas en página (56) y son lavadas con CH₂Cl₂ y acetona antes de su uso.

Los tubos de ensayo utilizados (15 x 85 PYREX y 100 x 13 de borosilicato), las microcolumnas de elución, las pipetas Pasteur y puntas de plástico

de pipeta automática, son utilizados una sola vez, desechándose después de su uso.

Diluciones de antisuero

a) Dilución 1:1000

Solución equilibradora de fosfato de sodio (0.1 M, pH 7.0) (aproximadamente 50 ml.) en frasco volumétrico de 100 ml.

Se añaden 2 ml. de Gammaglobulina humana (Merck. Co.) y 0.1 ml. del antisuero de cordero. Después de diluir hasta volumen con el buffer-fosfato, la solución se mezcla suavemente para evitar formación excesiva de espuma.

Esta dilución es estable a 4° un mínimo de 2 meses (ver p. 80).

b) Dilución 1:400.000 conteniendo H³ aldosterona.

13.000 pg de 1-2-H³ aldosterona purificada en 50% etanol, son secados con corriente de N₂ en frasco volumétrico de 100 ml. Se añaden buffer-fosfato (aproximadamente 50 ml.) y 2 ml. de gammaglobulina humana. Después de añadir 0.25 ml. de la dilución 1:1000, la disolución se completa hasta 100 ml. con buffer-fosfato y se mezcla suavemente. Esta dilución es estable a 4° un mínimo de 3 semanas (ver p. 82).

Buffer-fosfato-H³ Aldosterona.

13.000 pg. de 1-2-H³ aldosterona purificada en 50% etanol, son secados en un frasco volumétrico de 100

ml. al que se añaden 100 ml. de buffer-fosfato. Se mezcla por agitación y la disolución es almacenada a 4°.

Carbón activado recubierto de Dextrano.

500 mgr. de carbón activado (Fisher Norit A), es lavado 2 veces en buffer-fosfato, para eliminar partículas finas, se suspende en 100 ml. de buffer-fosfato y se añade a una solución de 50 mgr. de dextrano 70 (Pharmacia) en 100 ml. de buffer-fosfato. Almacenar a 4°.

b - Extracción de aldosterona.

Plasma heparinizado (5-10 ml.)^{*} con un contenido estimado de 300-1550 pg. de aldosterona, es pipeteado en tubos de vidrio con tapón de 70 ml.

Con objeto de poder calcular las pérdidas a lo largo del procedimiento, se añade a cada especimen 26 pg. de 1-2-H³ aldosterona (2500 cpm). La misma cantidad se añade en duplicado a viales de conteo, para ser usada como control. Teniendo en cuenta la parte alícuota del especimen original que llega al final del radioinmunoensayo, la masa de aldosterona añadida es despreciable no interfiriendo en el sistema final de equilibrio ya que en cada tubo de equilibrio del R.I.E. habrá menos de 2 pg. de

* En caso de especimenes con alta concentración de aldosterona como plasma de ven suprarrenal, se usará la cantidad que se estime contenga 300-1500 pg. y se hacen diluciones corrientes con agua

los 26 originales los cuales con suficientes por otra parte para el cálculo de pérdidas debido a su elevada actividad específica.

En cada grupo de especímenes se incluye en duplicado 8 ml. de un pool de plasma como control.

En cada grupo se incluye en duplicado un blanco de reagente, utilizando agua destilada en vez de plasma. En estos blancos no se añade 1-2 H³ aldosterona,

A cada tubo se añaden volumétricamente 35 ml. de diclorometano, y después de taparlos se agitan fuertemente por dos minutos. Se centrifuga y se elimina la fase plasmática por succión.

El extracto de diclorometano se lava con 5 ml. de 0.1 N NaOH por agitación. Se centrifuga y se elimina el NaOH por succión.

Se lava el extracto de diclorometano con 5 ml. de agua destilada, se centrifuga y se elimina el agua por centrifugación. Después de cada centrifugación, hay que tener cuidado en eliminar por succión además del sobrenadante, cualquier material interfásico.

Una vez realizados los lavados, se transfieren volumétricamente 25 ml. del extracto de diclorometano a un tubo cónico con tapón, de 40 ml. de capacidad. Entonces, el extracto es secado en baño a 40° y flujo de N₂.

c - Partición.

La partición se realiza entre éter de petróleo y 20% etanol acuoso.

El residuo seco de los tubos cónicos, se suspende en 3 ml. de 20% etanol acuoso y se añaden 10 ml. de éter de petróleo. Se agita 1 minuto y se centrifuga.

Después de centrifugar, se extrae la fase de petróleo éter por succión, incluyendo cualquier material interfásico, ya que si se deja en el espécimen produce posteriormente estriación a lo largo del desarrollo en la placa cromatográfica.

Una parte alicuota de 2 ml. de la fase etanol acuoso, se transfiere volumétricamente a tubos PYREX 100 x 13 mm. y se seca en baño de 40° con flujo de N₂.

En esta etapa del procedimiento, los especímenes una vez secos, pueden almacenarse 12-24 horas a -12°. Almacenamiento más prolongado causa adsorción del esteroide en el vidrio, con la consiguiente pérdida. Esto puede evitarse añadiendo etanol absoluto al tubo, dejándolo en reposo 30 a 60 minutos y evaporándolo inmediatamente antes de la cromatografía.

d - Cromatografía en capa fina.

Se utilizan placas 20 x 20 cm., recubiertas con una capa de Celite G de 375 mm. Se impregnan con etilenglicol:propilenglicol, por medio de

predesarrollo en acetona:etilenglicol:propilenglicol (89:6:5). En un máximo de 30 minutos después de la impregnación, se aplican los especímenes a la cromatoplaque, lo cual se realiza transfiriendo el espécimen del tubo seco en que se encuentre a un punto único de la placa por medio de una disolución de acetona:diclorometano (1:1), utilizando una micropipeta.

Conviene realizar la transferencia 4 veces con pequeñas cantidades de la disolución, humedeciendo las paredes del tubo y centrifugando antes de cada transferencia.

En cada placa, se pueden aplicar cuatro especímenes separados entre sí 3 cm. y aplicados a 1,5 cm. del origen de la placa. A cada lado de la placa (2 cm. del borde) y en el mismo nivel, se aplica el estándar de aldosterona que luego se visualizará. El final del frente del solvente se coloca a 15 cm. del punto de aplicación. Las placas se desarrollan dos veces en Tolueno:diclorometano:acetona (80:15:5), saturado con etilenglicol:propilenglicol (3:1). Es necesario realizar el segundo desarrollo tan pronto como el disolvente del primero se ha evaporado, que es alrededor de 9 minutos.

Después de la evaporación del solvente del segundo desarrollo, se protege el centro de la placa con una placa de vidrio limpia y se rocian los bordes (3 cm.) con la disolución de azul de tetrazolium

en hidróxido sódico metanólico, así se visualizarán los controles de aldosterona.

El area correspondiente a aldosterona (3 cm. de ancho y 0.5 cm. por encima y 1 cm. debajo del centro de la marca control de aldosterona) se separa de la placa con una espátula y por medio de succión el celite se transfiere a una microcolumna taponada con fibra de vidrio por un extremo, quedando el celite atrapado en la microcolumna.

El esteroide se eluye del celite, añadiendo por el extremo superior de la columna 4 ml. de diclorometano saturado con agua y recogiénolo a su salida por el extremo inferior en Tubo PYREX 15 x 85 y se evapora en baño a 40° con flujo de N₂, quedando así el especimen preparado para su elución para el radioinmunoensayo.

e - Radioinmunoensayo.

i - Equilibrio.

Tubos no reutilizables de borosilicato, son los usados para el radioinmunoensayo.

Se preparan en triplicado los standards de aldosterona inerte 0, 20, 50, 100 y 200 pg., pipeteando la cantidad correspondiente de las diluciones de trabajo.

Los especimenes que se estime contienen menos de 650 pg. de aldosterona en los tubos secos 15 x 85, son disueltos en exactamente 1 ml. de

acetona* y se transfieren partes alicuotas de 0.2 ml. a tres tubos de ensayo y a un vial de conteo. La parte alicuota en el vial de conteo, se utiliza para determinar las pérdidas de aldosterona tritiada en cada espécimen durante el proceso de purificación.

Es importante al pipetear los especímenes y estándares el usar pipetas con punta alargada para dejar la solución en el fondo del tubo. Los especímenes y los estándares son secados en horno de vacío a 30°.

"Totales" y "Ceros"

En Tubos de ensayo en triplicado pipetear

	Suero <u>Total</u>	Suero-0	Fosfato <u>Total</u>	Fosfato-0
Disolución				
H ³ Aldosterona antisuero (1:400.000)	0.5 ml.	0.5 ml.	-	-
H ³ Aldosterona Buffer-fosfato	-	-	0.5 ml.	0.5 ml.
Buffer-fosfato	0.5 ml.	-	0.5 ml.	-

Los tubos suero total y fosfato total, se agitan y se transfiere una parte alicuota de 0.5 ml. a viales de conteo, añadiendo 10 ml. de solución de conteo.

* En los especímenes que se considere contienen más de 650 pg. de aldosterona, se harán las correspondientes diluciones con acetona para que la parte alicuota a medir en el R.I.E. quede incluida en los límites de la curva estándar.

El significado de las mediciones o fosfato y total fosfato, es explicado con detalle en pág. (60) y consiste en un factor de corrección para el esteroide libre, que no es removido del sobrenadante después del tratamiento con carbón activado (1.5 - 2%).

A cada tubo estándar y espécimen, se añaden 0.5 ml. de la disolución H^3 aldosterona-antisuero 088 1:400,000. Se utilizará la misma pipeta 0.5 usada para la adición de la disolución a los tubos suero-total y suero-0 para mayor exactitud. Conviene depositar la disolución en el fondo del tubo, pero sin tocar las paredes con la pipeta para evitar contaminación.

Los tubos se agitan durante 1 minuto y cubriéndolos con papel de aluminio, se dejan a 4° durante 14-36 horas para lograr el equilibrio entre esteroide libre y marcado.

Separación de esteroide libre y unido.

La separación se hace cada vez en un máximo de 36 tubos. Si hay más de 36, se harán varias separaciones. Se incluyen los tubos estándar, incluyendo los tubos suero-0, los especímenes y los tubos fosfato-0.

Se coloca un máximo de 36 tubos en baño de hielo.

La suspensión de carbón activado recubierto de dextrano es mantenida también en baño de hielo

hasta su uso inmediato. Una parte alicuota de aproximadamente 40 ml. es colocada en un recipiente, conteniendo un magneto.

La suspensión es mezclada rápidamente con un mezclador magnético, mientras se realiza la adición a cada tubo de 0,5 ml. de la suspensión de carbón mediante una pipeta automática Eppendorf.

La adición de la suspensión a cada tubo, ha de ser rápida y uniforme, evitando cualquier agitación de los tubos durante la adición y el tiempo total utilizado en cada grupo de tubos será de 2 minutos o menos.

Después de haber añadido la suspensión de carbón-dextrano al último, los tubos se dejan en el baño de hielo sin ninguna agitación durante exactamente 10 minutos. Entonces, son transferidos con cuidado de que no se produzca agitación a vasos de centrifuga y son centrifugados a 1200 r.p.m. durante 5 minutos. Una vez centrifugados, utilizando una pipeta automática Eppendorf a la que se adaptan pipetas Pasteur desechables (5 3/4 pulgadas), se transfieren 0.5 ml. del sobrenadante a viales de conteo, teniendo la precaución de no incluir partículas de carbón en esta parte alicuota que contendrá el esteroide unido al anticuerpo, ya que el libre habrá sido adsorbido por el carbón dextrano.

Los cálculos están basados en la medición de la parte alicuota que contiene solo aldosterona

unida, por tanto la inclusión de partículas de carbón-dextrano en la parte alicuota daría resultados erróneos.

A cada vial se añaden 10 ml. de solución de conteo por medio de un dispensador automático.

Los viales se agitan vigorosamente antes de su conteo.

En cada grupo se introduce un vial que contenga 0.5 ml. del buffer-fosfato utilizado, más 10 ml. de la solución de conteo utilizada para ser usado como :Background (BKG.)".

Los viales se cuentan programando el contador de centelleo para 20 minutos o 10.000 conteos por especimen.

f - Cálculos

Las fórmulas empleadas en la determinación de la desviación estandard, error estandard y coeficiente de variación, son las siguientes.

Desviación estandard

$$D.E. = \sqrt{\frac{(X-\bar{X})^2}{(n-1)}}$$

X = resultado individual

\bar{X} = media de todos los resultados

n = número de resultados individuales

En un número suficiente de resultados, 68% de ellos quedarán incluidos en ± 1 D.E. de \bar{X} ; 95% en ± 2 D.E. de \bar{X} y 99% en ± 3 D.E. de \bar{X} .

Error estandar

$$E.E. = \sqrt{\frac{\sum (X-\bar{X})^2}{(n-1)(n)}} = \frac{D.E.}{\sqrt{n}}$$

Coefficiente de variación

$$C.V. = \frac{1 D.E.}{\bar{X}} \times 100$$

En cada grupo de triplicados, se calcula la media \pm 3 desviaciones estandar de los dos resultados más próximos, eliminándose el tercero en caso de no quedar incluido. Una vez calculada la media, se calculan los conteos por minuto corregidos para BKG y 0-fosfato, osea restando a los c.p.m. los correspondientes al BKG y los correspondientes al 0-fosfato corregido, que serían esteroide libre no separado por el carbón-dextrano.

Una vez obtenidos los conteos por minuto corregidos de los estandards y especimenes, se dividen por los conteos por minuto de 0.25 ml. de la dilución 1:400.000 de antisuero-aldosterona tritiada, que corresponde a los tubos suero-total anteriormente descritos. Este cociente dará el porcentaje unido al anticuerpo en los estandards y blancos-reagentes.

El porcentaje de aldosterona libre y la relación libre/unido, (L/U), son también calculados. Los resultados de los estandards son llevados a un sistema de coordenadas, en función de la concentración de aldosterona, construyéndose así la curva estandar.

Los conteos totales originales de cada espécimen, hay que calcularlos individualmente, pues hay que incluir los conteos de la aldosterona tritiada que ha llegado al espécimen de la añadida al principio para el cálculo de pérdidas, a partir de este "suero total" corregido se calculan los porcentajes unido, libre y la relación L/U como en el caso de los standards y blancos de reagente.

$$\text{Total individual} = T + A/2$$

donde T es el total de la curva standard expresado en c.p.m. corregido para BKG y factor fosfato, y A son los conteos por minuto (c.p.m.) corregidos para BKG de los 0.2 ml. parte alícuota utilizada para calcular las pérdidas, que es la misma cantidad que va al R.I.E. en triplicado.

La concentración de aldosterona en cada espécimen se lee directamente de la gráfica standard.

Las pérdidas durante el procedimiento para cada espécimen, se calculan a partir de los conteos medidos en los 0.2 ml. separados del espécimen, antes de incluirlo en el radioinmunoensayo y se expresa como porcentaje del total de aldosterona tritiada añadido a cada espécimen al principio del procedimiento.

$$\% \text{ de Aldosterona recobrada} = \frac{A}{B} \times 100 \times \frac{1}{0.2} \times \frac{35}{25} \times \frac{3}{2}$$

A = c.p.m. corregidos para BKG en 0.2 ml.

B = c.p.m. corregidos para BKG en H³ aldosterona inicial.

En el caso de especímenes consistentes en 8 ml. de plasma, los cálculos para determinar la concentración final serán:

$$\frac{C - D}{E} \times \frac{35}{25} \times \frac{3}{2} \times \frac{1}{0.2} \times \frac{100}{8} \times \frac{1}{1000} = \text{ng/100 ml.}$$

C = pg. especímen leídos directamente de la curva estándar.

D = media en pg. de los blancos reagente.

E = % de H³ aldosterona recobrado en el espécimen A.

g - Ejemplo de curva estándar y del cálculo de concentración de Aldosterona en muestras.

En Tabla (26) se describe un ejemplo de curva estándar, con la inclusión de los conteos de cada triplicado, hasta la relación L/U obtenida para cada punto de la curva. Los triplicados en recuadro son los que no se han incluido en el cálculo por no entrar en el margen de la media de los otros dos ± 3 desviaciones estándar.

La primera columna incluye el tiempo de conteo de los triplicados, segunda columna los conteos sin corregir medidos en el tiempo dado. La tercera columna indica la media de conteos por minuto corregidos para BKG y 0-fosfato \pm error estándar.

Cuarta columna la aldosterona unida expresada como porcentaje del total \pm error estandard. Quinta columna el porcentaje de aldosterona libre y sexta columna la relación aldosterona libre/unida.

La curva correspondiente se ha expresado en función de la relación L/U y en función del porcentaje unido (% U) (Fig. 8).

En la Tabla (27) se incluyen los cálculos de las pérdidas individuales en cada espécimen y el cálculo de los totales individuales utilizados en la Tabla (26) en cada espécimen individual.

En la Tabla (28) están indicados los cálculos de la concentración final de cada espécimen en ng/100 ml. a partir de los valores leídos en la grafica estandard.

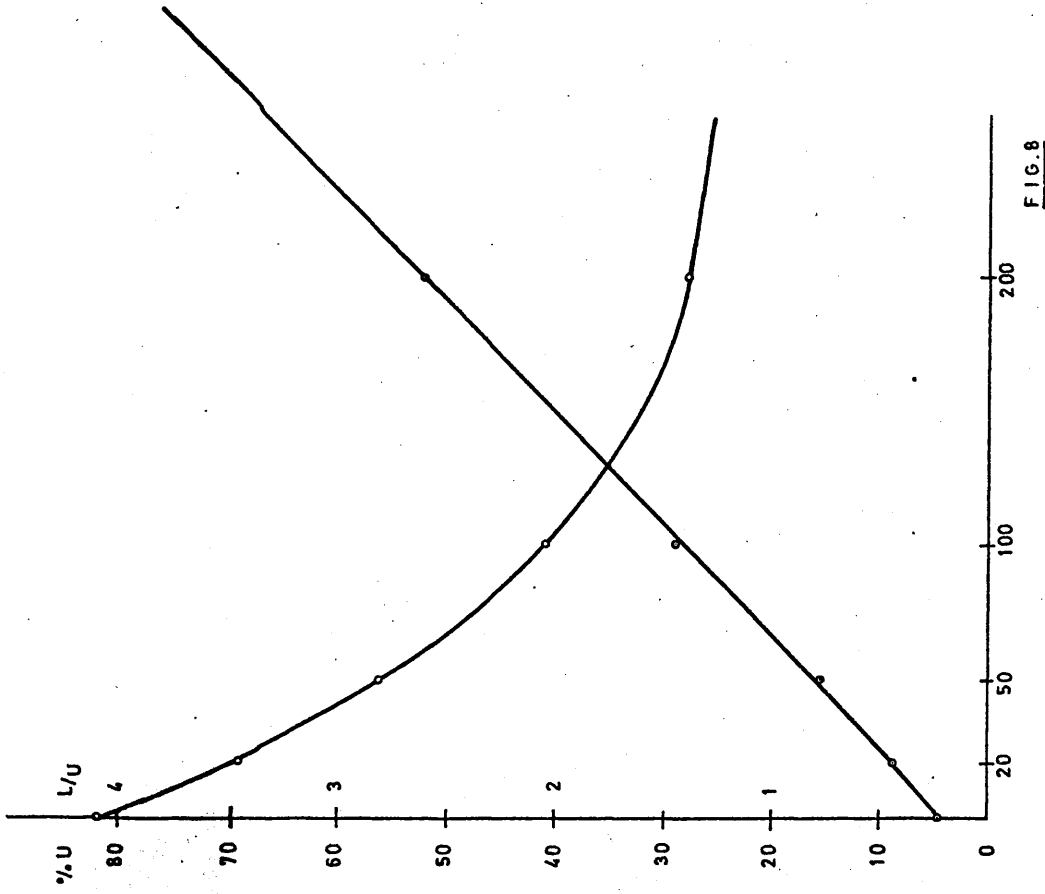


FIG. 8

	Tiempo conteo triplicados minutos	Conteos totales tripl.	Media C.P.M. ±E.E.	Media % Unido ± E.E.	Media % Libre	Libre/Unido
B.K.G.	20	425	21,25			
T.P.	<u>3.73</u> 3.64	10.000	2730			
T.	<u>3.63</u> 3.75	10.000	2649±4	100±0.13		
O.P.	20	1329 1428	46.26	1.69		
0	4.55 <u>4.70</u>	10.000	2147±17	81.07±0.65	18.93	0.23
20	5.25 <u>4.82</u>	10.000	1834±4	69.22±0.14	30.78	0.44
50	6.44 6.54	10.000	1486±15	56.11±0.55	43.89	0.78
100	8.62 <u>8.82</u>	10.000	1079±13	40.75±0.50	59.25	1.45
200	12.45 <u>12.78</u>	10.000	733±3	27.66±0.11	72.34	2.61
1 (Blanco)	4.94 4.75	10.000	1996±23	75.36±0.88	24.64	0.33
2 (Blanco)	4.78 <u>4.77</u>	10.000	2027±2	76.51±0.08	23.49	0.31

TABLA 26

Especímenes calculados con T. individual.

	<u>Tiempo</u> <u>Conteo</u> <u>triplicados</u> <u>minutos</u>	<u>Conteos</u> <u>totales</u> <u>tripl.</u>	<u>Media</u> <u>C.P.M.</u> <u>± E.E.</u>	<u>Media</u> <u>% Unido</u> <u>± E.E.</u>	<u>Media</u> <u>% Libre</u>	<u>Libre/Unido</u>
3	8.11 8.43 8.30	10.000	1141	41.55	58.45	1.41
4	8.15 8.03 8.06	10.000	1176	42.89	57.11	1.33
5	8.47 8.69 8.49	10.000	1112	40.47	59.53	1.47
6	6.33 6.37 6.24	10.000	1507	54.79	45.21	0.82
7	9.73 9.72 9.27	10.000	961	35.03	64.97	1.85
8	12.24 12.69 12.67	10.000	721	26.22	73.78	2.81

TABLA 26 BIS

Pérdidas Individuales
Calculo a partir de 1/5 parte alicuota

	<u>Tiempo conteo</u>	<u>Conteos totales</u>	<u>c.p.m. corr. BKG</u>	<u>% Recobrado</u>
B.k.g.	20	425	21.25	
Control H ³ Aldo.	3,96	10.000	2504	
Control H ³ Aldo.	4,07	10.000	2436	2470 = 100%
1 (Blanco)	20	421	0	
2 (Blanco)	20	419	0	
3	20	4299	193,7	82,35%
4	20	4147	186,1	79,12%
5	20	4385	197,9	84,16%
6	20	4489	203,2	86,38%
7	20	4209	189,2	80,43%
8	20	4457	201,5	85,64%

$$\% \text{ Recobrado} = \frac{\text{Cpm corr. para Bkg en } 1/5 \text{ parte alicuota}}{\text{Cpm Control corr. p. Bkg}} \times 100 \times \frac{1}{0,2} \times \frac{35}{25} \times \frac{3}{2}$$

Totales Individuales

3	2745,85
4	2742,05
5	2747,95
6	2750,60
7	2743,60
8	2749,75

$$\text{Totales Individuales} = \text{Cpm Total corr. Bkg} + \frac{\text{C m corr. Bk de } 1/5}{2} \text{ . al}$$

	<u>Pg.</u> <u>leídos</u> <u>en</u> <u>gráfica</u>	<u>Corr.</u> <u>para</u> <u>blancos</u> <u>reagente</u>	<u>Corr.</u> <u>para</u> <u>partes</u> <u>alícuotas</u>	<u>Corr.</u> <u>para</u> <u>perdidas</u> <u>%</u>	<u>Corr.</u> <u>para</u> <u>volumen</u> <u>especimen</u> <u>ng./100ml.</u>	<u>Mg./100ml.</u>
1	9					
2	7					
3	101	93	976,5	1185,79	14822	14,82
4	94	86	903	1141,30	14266	14,26
5	106	98	1029	1222,67	15283	15,28
6	52	44	462	534,85	6685	6,68
7	137	129	1354,5	1684,07	21050	21,05
8	218	210	2205	2574,73	32184	32,18 (x)

TABLA 28

Cálculo de concentraciones individuales
en cada espécimen a partir de los valores
obtenidos en la gráfica.

(x)

Al quedar el valor correspondiente al espécimen nº 8 fuera de los límites de la gráfica considerados como útiles (0-200 pg.), el valor final de 32,18 ng/100ml. no es considerado como válido, debiéndose determinar de nuevo la concentración de Aldosterona a partir de una parte alícuota del espécimen original para que la lectura en la gráfica quede dentro de los límites utilizados.

A-5 Resultados experimentales.a - Pérdidas de Aldosterona en el procedimiento.

Para determinar el porcentaje de aldosterona perdida a lo largo del procedimiento de purificación, se calculó la cantidad de 1-2-H³ aldosterona recuperada en 101 especímenes, expresándola como porcentaje de la cantidad añadida al espécimen al principio del procedimiento.

La media recuperada en 101 especímenes fue:
85.81% \pm 2.84% (1 desviación estándar).

b - Precisión y exactitud. Desviación estándar (D.E.).

Coefficiente de variación y límites de confianza del método.

i - D.E. y Coeficiente de variación en diez determinaciones de un pool de plasma.

El valor medio de diez determinaciones de un pool de plasma obtenido en un banco de sangre, fue 7.15 ng% con una desviación estándar de 0.39 ng%, coeficiente de variación de 5.45%.

ii - D.E. en 34 duplicados de un pool de plasma.

Partes alicuotas de 8 ml. de un pool de plasma utilizado como control, fueron extraídos y cuantificados en duplicado en cada grupo de determinaciones.

El valor medio de 34 pares de duplicados fue 6.70 ng%, con una media de diferencia entre duplicados de 0.51 ng%.

El cálculo de la desviación estandard, puede ser calculada en base de la diferencia entre duplicados, según el estudio estadístico de Freier (256), considerando que la media de la diferencia entre duplicado \bar{R} es igual a 1.128 veces la desviación estandard del método.

Para establecer los límites de confianza de un método analítico, puede considerarse que son definidos por ± 3 D.E., quedando en estos límites el 99% de los resultados y que calculando la media de la diferencia entre duplicados analizados por separado \bar{R} , 3 desviaciones estandard son igual a $1.88 \bar{R}$ y que por tanto los límites de tres desviaciones estandard de un valor medio, vendrán dados por Media $\pm 1.88 \bar{R}$.

El valor de \bar{R} para los 34 duplicados (68 especimenes) dió un valor de 0.3989361 y aplicando la fórmula $1.28 \bar{R} = \text{D.E.}$, la desviación estandard dió un valor de 0.45 ng%. Utilizando la fórmula tradicional

$$\text{D.E.} = \frac{(X-\bar{X})^2}{n-1}$$

el valor calculado fué de 0.39 ng% en buen acuerdo con el anterior.

iii - Aldosterona inerte recobrada en el método.

Otro modo de evaluar la especificidad y exactitud del método, consistió en la adición de cantidades conocidas de aldosterona inerte al especimen original en el tubo de extracción, conteniendo

plasma preextraído repetidas veces, osea libre de aldosterona.

La misma determinación se hizo utilizando plasma de enfermo con adrenalectomia bilateral. Los resultados están individualizados en la Tabla (29).

La media de aldosterona inerte recobrada, osea cuantificada por el método, expresada como % de la adicionada, fué de 98.74%.

c - Especificidad del método. Blancos reagente.
Blancos de plasma pre-extractado y plasma de adrenalectomizado.

Como se ha indicado antes en la descripción del protocolo, los blancos reagente de agua destilada, son tratados igual que los especímenes a lo largo de todo el procedimiento, sustrayéndose su valor del obtenido en cada espécimen. En 68 determinaciones, su valor medio fué de 5.21 pg. con una desviación estandard de 3.32 pg.

Otro modo de determinar la especificidad del método, fué el cuantificar partes alicuotas de plasma previamente extractado repetidas veces con CH_2Cl_2 , osea libre de aldosterona y plasma de paciente adrenalectomizado, y por tanto también libre de aldosterona. Los valores obtenidos de 4 pg. y 2 pg. respectivamente, son similares a los obtenidos en los blancos de reagente

<u>ALDOSTERONA AÑADIDA A:</u>	<u>pg. añadidos</u>	<u>pg. Recobrados</u>	<u>% Recobrado</u>
PLASMA PRE-EXTRAIDO	0	4	---
	0	4	---
	493	466	94.59
	493	489	99.24
	985	971	98.60
	985	1004	101.89
	1478	1485	100.44
	1478	1423	96.31
	1970	1882	95.56
	1970	1894	96.17
PLASMA DE PACIENTE ADRENALECTOMIZADO	0	2	---
	0	3	---
	276	247	89.32
	276	285	103.46
	276	305	110.55

d - Medición comparativa de especímenes de plasma de vena adrenal cuantificados por el método de Tait.

El único método disponible hasta ahora para la determinación de la concentración de aldosterona en plasma periférico, eran los métodos de doble dilución isotópica, como ya se ha indicado en la introducción. Esto es debido a que los bajos niveles de la hormona en plasma periférico, no permiten su cuantificación por métodos colorimétricos o fluorimétricos.

En plasma obtenido directamente de vena suprarenal, por medio de cateterización selectiva, la concentración de aldosterona es superior, llegando en casos de hiperaldosteronismo a concentraciones de 10 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

Estos niveles de aldosterona pueden ser determinados con el método de Tait et. al. (138) que consiste en la formación de una etiolactona de aldosterona por el método de Wick después de su purificación por cromatografía en celite, en un sistema acetato-formamida-agua (100:5:5) y una vez formada la etiolactona, cromatografía en papel sistema ciclohexano:benceno:metanol:agua (5:3:5:1), cuantificando el espécimen por medida en fotofluorómetro de la soda-fluorescencia, desarrollada por la aplicación de azul tetrazolium en hidróxido sódico y posterior calentamiento.

El límite de sensibilidad de este método es 0.5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, muy superior a los niveles periféricos,

pero útil para determinaciones diagnósticas en plasma de vena adrenal.

Con el fin de evidenciar la validez del método de radioinmunoensayo, se ha determinado la concentración de aldosterona con ambos métodos en especímenes obtenidos por cateterización selectiva de vena suprarrenal, comparando ambos resultados.

Como ya se ha indicado en el protocolo del método, en la determinación de estos especímenes con una concentración de aldosterona muy superior a la periférica, se han utilizado diluciones del plasma original para que la lectura final quede incluida en los límites de la curva estandar.

En la Tabla (30) se individualizan los distintos resultados obtenidos con ambos métodos.

En esta Tabla no se detalla la metodología en la obtención de cada espécimen, pues la comparación entre ambos resultados es lo que se intenta. En los capítulos dedicados a la aplicación clínica del radioinmunoensayo, se especifica la técnica y diversos estímulos utilizados para la obtención de estos especímenes, viéndose la utilidad del radioinmunoensayo en la determinación de aldosterona, no sólo en plasma periférico, sino en plasma de vena suprarrenal.

e - Reproducibilidad de curvas estandar.

Una vez estandarizado el método, un sistema apropiado de determinar globalmente la reproducibilidad del método es comparar distintas curvas estandar

<u>Valores determinados por Radioinmunoensayo ug/100 ml.</u>	<u>Valores determinados por método de Tait ug/100 ml.</u>
0.07	< 0.50
0.08	< 0.50
0.22	< 0.50
0.19	< 0.50
4.85	4.90
6.09	5.60
0.68	0.89
2.51	2.60
7.57	8.60
4.95	5.70
4.37	4.10
3.94	4.10
11.45	11.60

TABLA 30

Comparación de resultados obtenidos por R.I.E. y por el método de Tait en la determinación de concentración de aldosterona en diferentes especímenes de plasma de vena suprarrenal.

obtenidas en distintas ocasiones, pues si no existe gran variación es una indicación de que las técnicas seguidas en la caracterización de los standards, preparación de diluciones de antisuero, de adsorbente y almacenamiento son reproducibles.

En la Tabla (31), se especifican los valores de 28 curvas obtenidas a lo largo de distintas determinaciones, durante un periodo de cinco meses, expresándose el punto 0 y la caída en porcentaje unido para las distintas concentraciones de aldosterona estandard, viéndose que la reproducibilidad de la curva es satisfactoria.

% Unido en el punto 0 pg.	Caida en % Unido			
	20 pg.	50 pg.	100 pg.	200 pg.
78	9	18	27	46
73	7	21	34	47
80	9	25	36	49
81	11	23	39	50
81	12	25	40	53
76	9	16	31	47
80	5	19	32	48
79	7	26	38	52
81	13	28	39	52
79	9	16	33	48
84	4	22	41	53
76	6	20	36	48
74	11	24	39	50
76	11	22	37	50
82	15	30	46	57
78	15	28	43	53
71	8	20	33	50
71	11	25	39	50
74	12	22	39	51
74	11	26	38	50
73	7	18	34	46
76	8	27	42	52
71	9	22	35	45
73	7	18	31	44
73	10	19	35	48
76	8	25	39	48
72	8	20	33	43
72	9	19	31	41

TABLA 31

B - PARTE II ESTUDIOS CLINICOS.

Como aplicación del método anteriormente descrito, se determinaron en primer lugar, los valores normales de concentración de aldosterona en plasma periférico, comparándolos con los valores hasta ahora conocidos, determinados por otros métodos.

También se determinaron los valores de aldosterona ante estimulación postural, sobrecarga y depleción salina en sujetos normales.

Una segunda parte del trabajo clínico consistió en estudiar la posible variación diurna de concentración de aldosterona en plasma periférico. El tercer trabajo clínico consistió en el estudio de la supresión de aldosterona periférica, mediante la administración de mineralocorticoides, comparando el efecto supresor de Fluorinef y DOCA y una vez determinados los valores en sujetos normales, el estudio de supresión en pacientes con hipersecreción de aldosterona en sus modalidades primaria y secundaria.

El cuarto trabajo clínico consistió en el estudio de la secreción de aldosterona en enfermos anéfricos, estudiando los mecanismos de regulación de aldosterona en estos pacientes.

A continuación, se describen los métodos utilizados en los estudios clínicos. Los protocolos seguidos en cada caso se describen en la sección correspondiente.

Métodos

Concentración de Aldosterona en plasma periférico.

Fué determinada por el método de radioinmunoensayo original, descrito en la primera parte de este trabajo.

Concentración de Aldosterona en plasma de vena suprarrenal.

Fuó también determinada por el método de radioinmunoensayo descrito, con la única variante de distintas diluciones utilizadas en correspondencia a la mayor concentración de aldosterona en estos especímenes.

Tasa de Secreción de Aldosterona en 24 horas (Secretary rate)

Estas determinaciones se realizaron por el método de Melby et al. descrito previamente (141). La secreción de aldosterona, se calcula a partir de la actividad específica de Tetrahidroaldosterona urinaria en una colección de orina de 24 horas después de la inyección intravenosa de 5 microcurios de 1-2- H^3 Aldosterona. Un extracto de la décima parte de este volumen, es tratado con β glucuronidasa y purificado en tres sistemas cromatográficos de capa fina. Sílica Gel es usada como adsorbente en los tres sistemas, excepto que en el segundo sistema se utiliza una solución al 2% de borato sódico en vez de agua para su preparación.

Las placas son desarrolladas por cromatografía ascendente.

Los solventes utilizados son los siguientes: etilacetato: acetona:agua (80:20:5); acetona:benceno:agua (90:10:8) y cloroformo:metanol:agua (90:10:1).

Las muestras eluidas del último cromatograma son disueltas en 2 ml. de metanol absoluto. Partes alicuotas son removidas para conteo de H^3 en contador líquido de centelleo.

La cuantificación se realiza por medio de la reacción de Lewbart y Mattox (257). La secreción de aldosterona en 24

horas (en microgramos por 24 horas), se calcula dividiendo la actividad específica de tetrahidroaldosterona (conteos por minuto por microgramo), por la dosis de aldosterona marcada inyectada (conteos por minuto). Los valores normales son de 50 μ g a 150 μ g en 24 horas.

Actividad de renina plasmática

La medición de actividad plasmática de renina, fué realizada en los laboratorios New England Nuclear Biomedical Assay Lab. de Boston, según la técnica de Gunnels y Grim previamente descrita (258). Los valores normales, según este método, están comprendidos entre 75 y 275 ng %.

Concentración de Cortisol en plasma.

Tanto en plasma periférico, como en plasma de vena adrenal, la concentración de cortisol fué determinada según una variación del método de desplazamiento competitivo de Murphy (157).

En este método, se ha utilizado como ligando, una dilución de plasma con elevada concentración de transcortina, obtenido de mujer sometida a tratamiento estrogénico; como trazador $1-2 \text{ H}^3$ Corticosterona y como adsorbente separados de las fracciones libre y unida, se ha utilizado Florisil.

Cateterización de vena suprarrenal.

Los estudios realizados por cateterización de vena adrenal, se han realizado según la técnica de Melby et al. previamente descrita (141), con la única variante de que las colecciones de sangre obtenidas fueron de 5 ml. Por medio de esta técnica, se obtienen especímenes de la vena

adrenal correspondiente determinando niveles de Cortisol para comprobar la correcta colección del espécimen.

En los casos en que se realizó infusión de ACTH y angiotensina, el protocolo seguido es igual que el descrito previamente por Spark y col. (169).

La infusión de Angiotensina se realizó a un ritmo suficiente para mantener una presión diastólica, 10 mmHg por encima del valor basal. La dosis requerida para lograr este efecto, fué aproximadamente de 200 ng/minuto en pacientes con hiperaldosteronismo primario y unos 500 ng/minuto en los demás. Después de 10 minutos de infusión de angiotensina, se obtuvo un espécimen de sangre (post-angiotensina).

En los casos en que se realizó estimulación con ACTH, se inyectaron 0.25 mgr. de β -1-24 ACTH (Cortrosyn, Organon Inc., N.J.) intravenosa durante 30 segundos, recoigiéndose un espécimen de sangre de vena adrenal a los 5 minutos.

En el caso en que se realizó estímulo postural durante la cateterización de venas suprarrenales, se realizó por medio de una mesa de balanceo.

B-1 Determinación de valores normales. Estudios posturales y de sobrecarga y depleción salina. Variación liurna.

La validez del método descrito es contrastada finalmente, mediante la determinación de aldosterona plasmática en sujetos sometidos a distintas maniobras conocidas como estimuladoras e inhibidoras de la secreción de aldosterona, comprobando si dichas maniobras reflejan un aumento o descenso del nivel plasmático de aldosterona, determinado por el radioinmunoensayo.

Los estudios realizados fueron los cambios producidos por la concentración de aldosterona plasmática por cambios posturales, maniobra conocida como estimuladora de la secreción de aldosterona.

Otros estudios también realizados en sujetos normales, consistieron en medida de aldosterona periférica, tras sobrecarga o depleción salina, maniobras conocidas como supresoras y estimuladora de la secreción de aldosterona respectivamente.

a - Protocolo

Estudio postural

Se estudiaron nueve sujetos normales, 6 hombres y 3 mujeres con edades comprendidas entre 23 y 26 años.

Todos ellos fueron sometidos a un examen físico, siendo este normal con presión arterial dentro de los límites normales para su edad.

Antes de comenzar los estudios, se determinaron sodio, potasio, cloro, reserva alcalina y BUN, siendo estos parámetros normales.

Con objeto de utilizar los valores obtenidos como control normal de comparación en estudios ambulatorios para el diagnóstico de hiperaldosteronismo, estos sujetos controles permanecieron en su dieta habitual.

Los sujetos fueron admitidos en una unidad metabólica el día anterior al estudio. Después de haber permanecido en posición decubito durante 8 horas, el primer espécimen de sangre periférica fué obtenido a las 8 A.M.

Los sujetos permanecieron entonces dos horas en posición erecta, permitiéndoseles ambulaci3n y se obtuvo un segundo espécimen a las 10 A.M.

Los especimenes de sangre periférica, tanto en este estudio como en todos los descritos, fueron recogidos en tubos heparinizados, centrifugados inmediatamente y el plasma separado y conservado a -12° hasta su cuantificaci3n.

b - Protocolo

Estudios de sobrecarga y depleci3n salina.

Se estudiaron 4 sujetos normales de sexo masculino y de edades comprendidas entre 24 y 32 años, seleccionados con los mismos criterios que los sujetos en el grupo anterior.

Los sujetos estuvieron consumiendo su dieta habitual hasta el comienzo del estudio. Las dietas especiales fueron preparadas y consumidas en una unidad metabólica.

Todos los especímenes de sangre periférica, fueron obtenidos a las 10 A.M., después de haber permanecido 2 horas en posición erecta, en régimen ambulatorio.

Una vez obtenido el espécimen control, los sujetos comenzaron una dieta de 240 mEq de sodio/24 h., que consumieron durante 72 h. Entonces, la dieta fué cambiada a 10 mEq de sodio/24 h., que los sujetos consumieron durante 96 h.

Se obtuvieron especímenes de sangre periférica para la determinación de aldosterona y actividad de renina todos los días del estudio a las 9 A.M. en todos los sujetos, excepto en R.S. en que por error no fué obtenido el espécimen del tercer día del estudio.

c - Protocolo

Estudio variación diurna.

Este estudio fué realizado como estudio previo.

Las determinaciones de aldosterona fueron realizadas en seis de los voluntarios citados en el protocolo del estudio postural siendo por tanto iguales los criterios de selección.

Los dos primeros especímenes de plasma periférico obtenidos son los mismos que los indicados en el estudio postural osea el primer espécimen fué obtenido a las 8 A.M. después de 8 horas en posición supina. Después de dos horas en posición erecta en régimen ambulatorio (en pie y sentado) se obtuvo un segundo espécimen. A continuación los sujetos permanecieron en régimen ambulatorio pudiendo permanecer

en pie o sentados durante toda la duración del estudio, obteniéndose especímenes de sangre periférica a las 12 mediodía, 4 P.M., 8 P.M. para la determinación de aldosterona.

d - Resultados estudio postural

Los resultados del estudio postural realizado en nueve voluntarios, están indicados en la Tabla (32), donde se expresan individualmente sexo, edad y los valores de aldosterona periférica obtenidos en posición decubito y después de dos horas en posición erecta, indicándose al final de la Tabla los valores medios y la desviación estandard.

La media de concentración de aldosterona en posición decubito es de 6.92 ng.% y la media de los resultados obtenidos después de dos horas en posición erecta, es de 20.5 ng.%. Calculando los porcentajes, la media del aumento de aldosterona plasmática después de dos horas en posición erecta, fué de 303%, con una variación de 200% a 506%.

En la discusión de resultados, se compararan estos valores con los hasta ahora publicados en la literatura, obtenidos por métodos de dilución isotópica.

e - Resultados

Estudio de sobrecarga y depleción salina.

Los resultados obtenidos en los 4 sujetos estudiados están individualizados en la Tabla (33), donde se expresan los valores obtenidos de aldosterona plasmática y actividad de renina a las 9 A.M., después de dos horas de ambulación. El valor que corresponde a una máxima depleción de sodio, es el correspondiente al día 3 y el correspondiente a una máxima sobrecarga sódica el del día 7.

En las figuras (9) y (10), se expresan graficamente los resultados obtenidos de niveles de aldosterona y renina. El valor correspondiente al tercer día de R.S. no fué obtenido por error. En la Fig. (11) se expresan los valores obtenidos con máxima repleción y depleción salina.

En la Tabla (34) se expresan los valores obtenidos de aldosterona plasmática que corresponden a máxima depleción y sobrecarga, indicándose individualmente el porcentaje de descenso y elevación de aldosterona en respuesta al estímulo correspondiente.

La media de descenso de la concentración periférica de aldosterona en respuesta a una sobrecarga sódica, correspondiente a una dieta de 240 mEq. de Na/24 h. durante tres días, fué de un 38% del valor control.

La media de elevación de la concentración de aldosterona en respuesta a una depleción sódica correspondiente a una dieta de 10 mEq Na/24 h. durante cuatro días fué de 545% del valor control.

f - Resultados.

Estudio variación diurna.

Los resultados individuales están indicados en la Tabla (35) indicándose los resultados individuales de la concentración periférica de aldosterona en cada control así como la media de resultados en cada hora en que se obtuvo un espécimen.

La media de resultados a las 8 A.M. después de ocho horas en posición decubito fué de 6.96 ng.% elevándose

a 21,82 ng.% después de dos horas en posición erecta. Después de continuar en regimen ambulatorio se observó a las dos horas un nuevo descenso con una media de 12,63 ng.%. En estas tres observaciones los cambios individuales fueron uniformes de acuerdo con las variaciones indicadas en la media de los resultados. A las 4 P.M. se observó una nueva elevación de la media de resultados hasta 19,83 ng.% correspondiente a una elevación en los valores de tres controles con un descenso en otros dos permaneciendo igual en uno. A las 8 P.M. se observó un ligero aumento de la media hasta 21,7 ng.% en relación con la medición anterior correspondiendo a un aumento en cuatro controles, descendiendo en otro y permaneciendo igual la concentración en uno de ellos.

	SEXO	EDAD	ALDOSTERONA ng/100 ml.		% Aumento
			SUPINO	ERECTO (2h.)	
D.W.	M	25	10.5	21.8	208
R.D.	M	24	7.1	33.0	467
K.V.	M	23	6.7	13.4	200
T.H.	M	25	8.1	19.0	234
J.H.	F	23	10.4	30.9	297
E.S.	F	25	7.9	22.0	279
H.S.	M	26	4.5	15.9	354
E.F.	M	25	4.3	9.5	211
G.F.	F	25	8.5	21.1	248
D.R.	F	23	4.5	22.8	506
W.G.	M	26	3.7	12.3	332
Media			6.92	20.15	303%
E.E.			0.73	2.20	29.90
D.E.			2.42	7.30	99.18

TABLA 32

Concentración de aldosterona plasmática en once sujetos normales después de posición decubito durante 8 horas y después de posición erecta durante dos horas.

	<u>R.S.</u>		<u>M.R.</u>		<u>B.G.</u>		<u>W.C.</u>	
	Aldo. ng. %	Activ. Renina ng. %	Aldo. ng. %	Activ. Renina ng. %	Aldo. ng. %	Activ. Renina ng. %	Aldo. ng. %	Activ. Renina ng. %
Control	16,7	125	8,9	158	4,4	190	7,7	151
Día-1	13,2	275	7,3	258	6,4	217	7,8	110
Día-2	8,2	178	3,5	135	3,9	174	3,7	107
240 mEq. Na.	---	---	3,5	142	1,3	181	2,6	100
Día-4	38,7	250	8,5	122	5,8	285	13,5	290
Día 5	63,5	421	11,9	286	16,1	303	32,0	397
Día-6	56,0	440	29,6	362	20,7	543	34,0	705
10 mEq. Na.	48,3	353	31,8	667	45,0	282	39,2	725

TABLA 33

Valores individuales de Renina y Aldosterona plasmáticas
obtenidos con sobrecarga y depleción salina en cuatro su-
jetos normales.

	CONTROL		SOBRECARGA 240 mEq.Na/24h.		DEPLECION 10 mEq.Na/24h.	
	<u>ALDO.</u> <u>ng.%</u>	<u>ALDO.</u> <u>ng.%</u>	<u>% DESCENSO</u>	<u>ALDO.</u> <u>ng.%</u>	<u>% ELEVACION</u>	
R.S.	16,7	8,2	49,10%	48,30	289,22%	
W.C.	7,7	2,6	33,77%	39,20	509,09%	
M.R.	8,9	3,5	39,33%	31,80	357,30%	
B.G.	4,4	1,3	29,55%	45,0	1022,27%	
MEDIA DE %			X = 37,94%		X = 544,72%	

TABLA 34

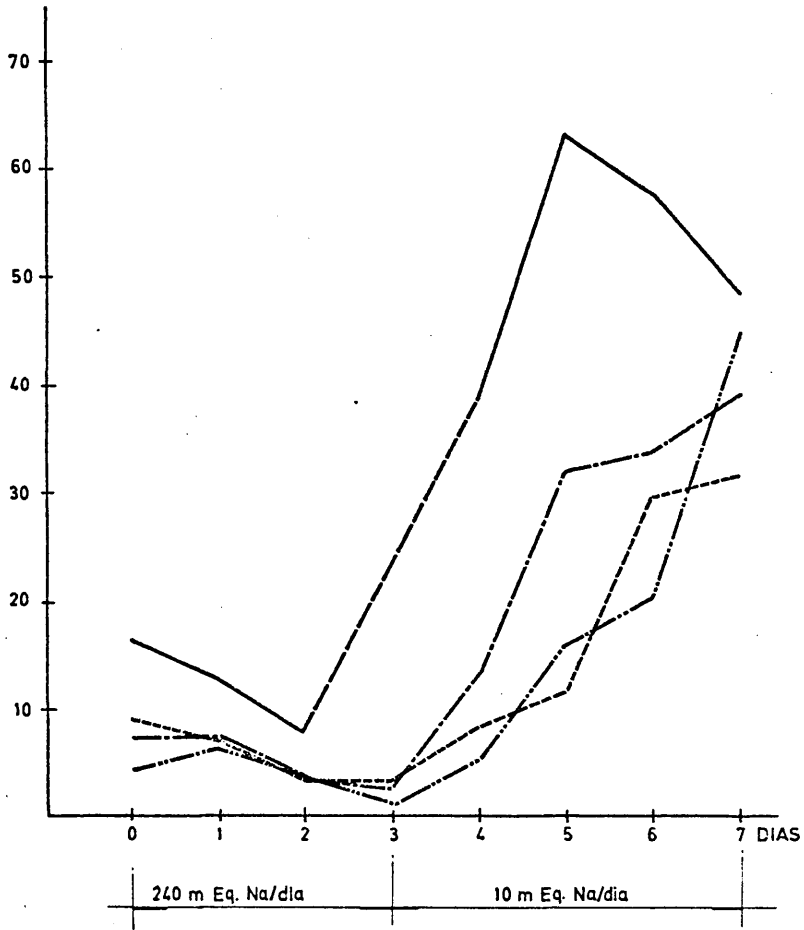
Porcentajes individuales y media de porcentajes de descenso y elevación de concentración plasmática de Aldosterona en respuesta a sobrecarga y depleción salina en cuatro sujetos normales.

	<u>8 A.M.</u> <u>DECUBITO</u>	<u>10 A.M.</u> <u>AMBULAT.</u>	<u>12 A.M.</u> <u>AMBULAT.</u>	<u>4 P.M.</u> <u>AMBULAT.</u>	<u>8 P.M.</u> <u>AMBULAT.</u>
D.W.	10.5	21.8	15.0	13.7	18.8
R.D.	7.1	33.0	19.0	35.7	35.8
D.R.	4.5	22.8	17.5	36.9	39.7
E.S.	7.9	22.0	14.5	26.0	8.5
T.H.	8.1	19.0	5.7	2.6	17.1
W.G.	3.7	12.3	4.1	4.1	10.3
MEDIA	6.96	21.82	12.63	19.83	21.7
E.E.	1.01	2.73	2.6	6.2	5.3
D.E.	2.5	6.7	6.4	15.2	6.8

TABLA 35

Variación diurna de niveles plasmáticos de Aldosterona
en 6 sujetos normales en régimen ambulatorio.

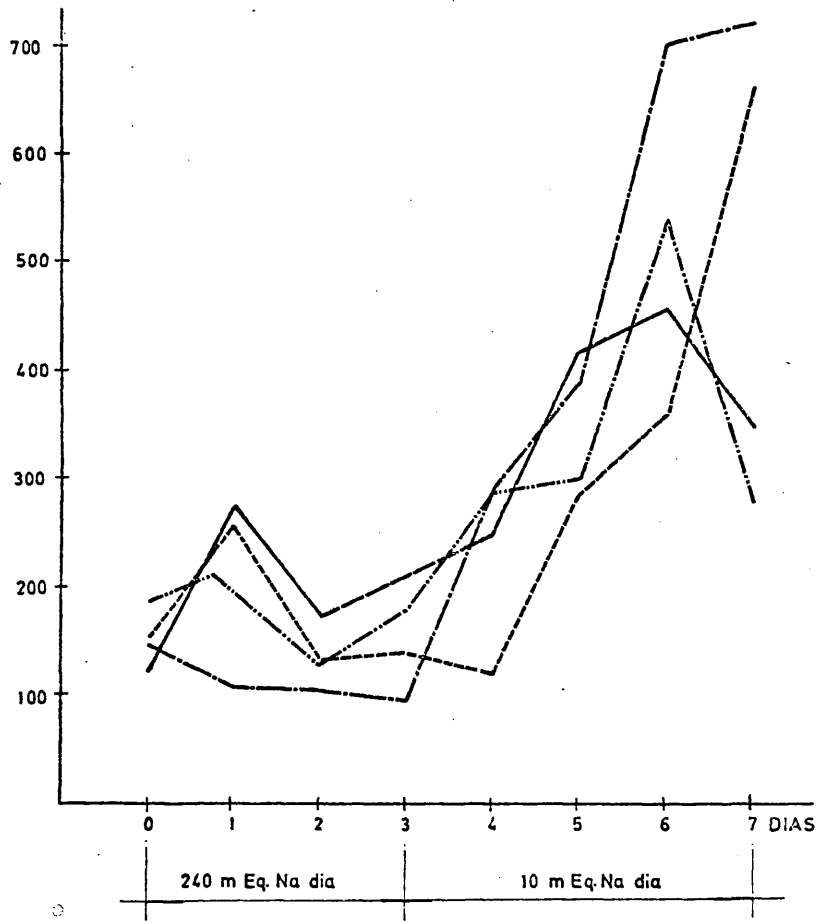
ALDOSTERONA
ng / 100 ml.



R.S. _____
M.R. _____
W.C. _____
B.G. _____

FIG. 9

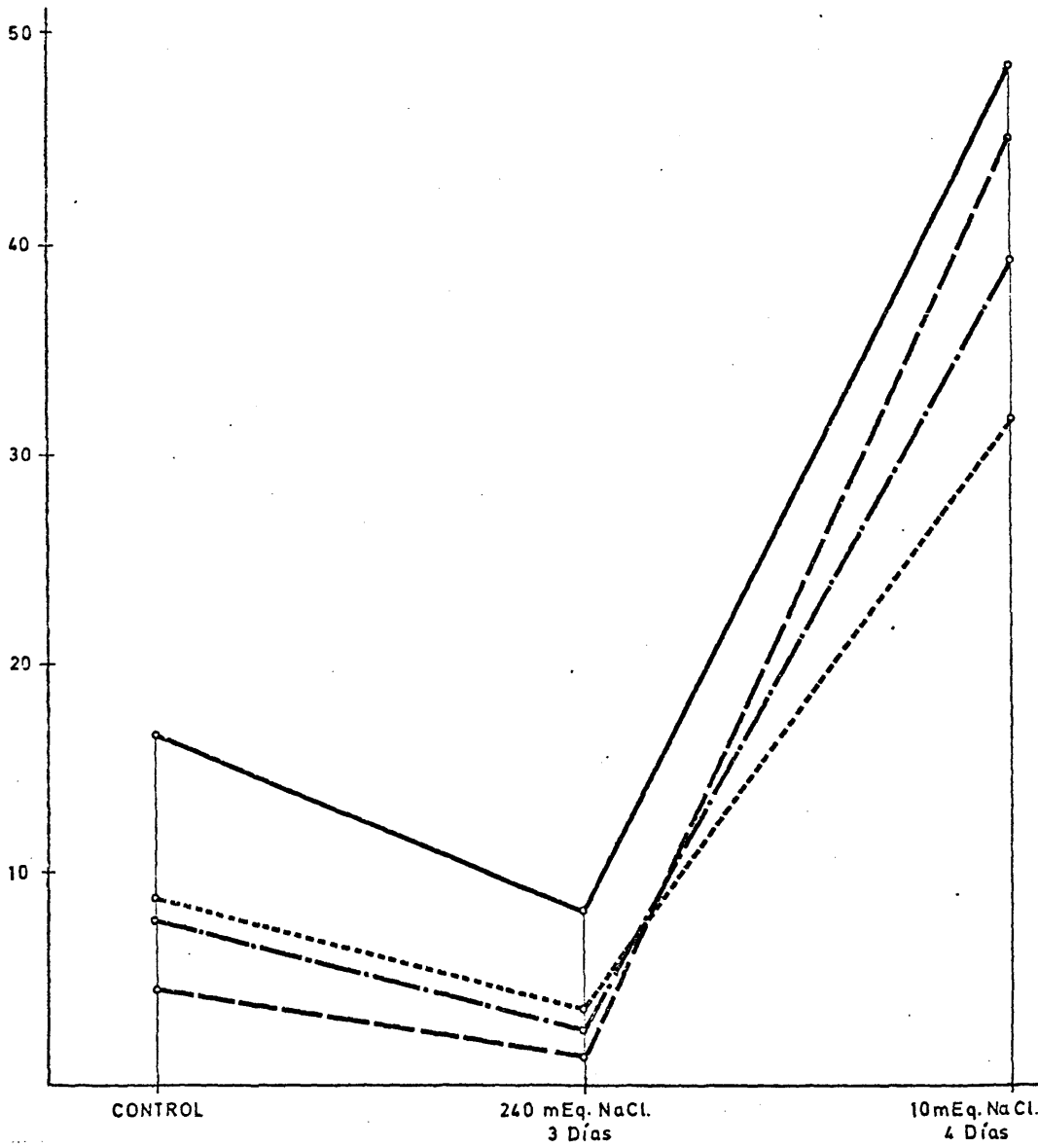
ACTIVIDAD
PLASMÁTICA
RENINA
ng/100 mL



R.S. _____
M.R. _____
W.C. _____
B.G. _____

FIG. 10

LDOSTERONA
ng%



- R. S. —————
- M. R. (dotted)
- W. C. - . - . - . (dash-dot)
- B. G. - - - - - (dashed)

FIG. 11

B-2 Estudios de supresión con mineralocorticoides de niveles plasmáticos de Aldosterona y su aplicación al diagnóstico diferencial entre hiperaldosteronismo primario y secundario.

a - Protocolos Clínicos.

i - Estudio en sujetos normales. Supresión con Fluorinef y DOCA.

Se estudiaron nueve voluntarios normales (8 hombres y 1 mujer) con edades comprendidas entre los 24 y 31 años.

Los criterios de admisión en el estudio fueron falta de antecedentes clínicos, examen físico normal y los parámetros de electrolitos, BUN plasmático y análisis de orina dentro de límites normales.

Los sujetos voluntarios fueron divididos en dos grupos.

Un primer grupo compuesto de cuatro sujetos a los que les fué administrada una dieta de 120 mEq de Sodio y 40 mEq de Potasio desde dos días antes de iniciar el estudio y durante los días en que se realizó el estudio.

Se obtuvo un primer espécimen de plasma periférico control a 8 A.M. después de permanecer 8 horas en posición decubito supino. Entonces se comenzó la administración de 0.1 mgr. de 9- α -Fluoro Cortisol (Fluorinef) via oral cada 6 horas por un total de 4 dosis = 0.4 mgr. Al día siguiente se obtuvo un segundo espécimen de plasma a las 8 A.M. después

de 8 h. en posición decubito supino.

Con objeto de utilizar el test de supresión de DOCA en enfermos ambulatorios en el segundo grupo de controles formado por 5 voluntarios, el espécimen control se obtuvo a las 10 A.M. después de permanecer dos horas en situación ambulatoria (sentados o en pie) Entonces se les administró acetato de DOCA (Organon Inc., West Orange, N.J., U.S.A.), 10 mgr. intramuscular cada 12 horas x 2 dosis (10 A.M. y 10 P.M.). A las 10 A.M. del día siguiente se obtuvo un segundo espécimen después de dos horas en régimen ambulatorio.

En dos voluntarios el protocolo se modificó continuando la supresión con DOCA durante tres días (10 mgr cada 12 h. = total 8 dosis), obteniendo un espécimen de plasma a las 10 A.M. de cada día para la determinación de aldosterona periférica y actividad de renina.

ii - Supresión con mineralocorticoides en enfermos con hiperaldosteronismo primario.

Se han estudiado siete enfermos con el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario. Estos enfermos fueron seleccionados a causa de hipertensión, hipokaliemia espontánea y respuesta al test de la espinorolactona. Los criterios definitivos para el diagnóstico fueron una tasa de secreción de aldosterona elevada después de dos días en dieta de 120 mEq. Na y 40 mEq. K, actividad de renina plasmática suprimida, 17 hidroxí y 17 cetosteroides normales

en orina de 24 h., supresibilidad de la tasa de secreción de aldosterona con la administración de mineralocorticoides durante tres días según los protocolos establecidos por Biglieri (DOCA 10 mgr. cada 12 h. x 3 dosis o Fluorinef 0.1 mgr cada 6 h. x 3 dosis), y finalmente estudios positivos de cateterización de venas suprarrenales.

En el estudio de cateterización se utilizó el método de radioinmunoensayo descrito para la determinación de concentración de Aldosterona.

Los siete enfermos citados fueron operados posteriormente y confirmado el diagnóstico de adenomas productores de aldosterona o hiperplasia modular bilateral. Los protocolos utilizados fueron los siguientes.

Supresión con 9- α -Fluorocortisol.

Se incluyeron tres enfermos en este grupo.

Día 1 - Después de dos días en dieta de 120 mEq. Na y 40 mEq. de K. Medida tasa secreción control.

Día 2 - Espécimen de plasma periférico a las 8 A.M. en posición decubito para determinación de aldosterona control. Una vez obtenido el espécimen se comenzó a administrar Fluorinef 0.1 mgr cada 6 h.

Día 3 - Espécimen de plasma periférico obtenido a las 8 A.M. en posición decubito después de cuatro dosis de Fluorinef (0.4 mgr). Enfermos fueron mantenidos en Fluorinef 0.1 mgr cada 6 horas.

Día 4 - Tasa de secreción después de 8 dosis de Fluorinef.

Supresión con DOCA

Cuatro enfermos con hiperaldosteronismo primario fueron incluidos en este grupo.

Día 1 - Después de dos días en la dieta descrita anteriormente tasa de secreción control.

Día 2 - Se obtuvo un espécimen control de plasma periférico. En dos enfermos (GP y IL) el espécimen se obtuvo a las 8 A.M. en posición decubito, en los otros dos a las 10 A.M. después de dos horas en posición erecta. Después de obtener los especímenes a los enfermos les fué administrada DOCA, 10 mgr, 1 M. cada 12 horas.

Día 3 - Se obtuvo espécimen para la determinación de aldosterona en plasma periférico al mismo tiempo y en la misma porción que en día 2 después de dos dosis de DOCA de 10 mgr. Los enfermos continuaron recibiendo DOCA 10 mg. cada 12 horas.

Día 4 - Tasa de secreción después de cuatro dosis de DOCA de 10 mgr.

En los enfermos con el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario se realizaron también estudios de cateterización de vena suprarrenal en fecha posterior al estudio y antes de la exploración quirúrgica.

Supresión con mineralocorticoides en enfermos con hiperaldosteronismo secundario.

Se han estudiado 7 enfermos con hipertensión acelerada e hiperaldosteronismo espontáneo establecido por una tasa de secreción de aldosterona elevada, suprimible con administración de mineralocorticoides según los protocolos de Biglieri, actividad de renina plasmática elevada después de 8 horas en posición decubito y falta de respuesta al test de espinorolactona.

Supresión con 9- α FF

Se incluyeron cuatro enfermos en este grupo. El protocolo fue igual al siguiente fue el mismo que en el grupo de enfermos con hiperaldosteronismo primario en supresión con 9- α Fluorocortisol.

Supresión con DOCA

Se incluyeron 3 enfermos en este grupo. El protocolo fue el mismo que en el de enfermos con hiperaldosteronismo primario en supresión con DOCA. Los especímenes para determinación de aldosterona plasmática fueron obtenidos a las 10 A.M. después de dos horas en posición erecta.

b - Resultadosi - Resultados de supresión con mineralocorticoides en sujetos normales.Fluorinef

Los resultados individuales de supresión con 0.4 mgr. de Fluorinef están indicados en la Tabla (36), indicándose también el porcentaje de descenso de concentración de aldosterona plasmática después de la supresión. La media de concentración de aldosterona periférica en los especímenes control fué de 11.05 ng% y de los especímenes post-supresión de 7.55 ng% siendo el porcentaje medio un 71.77% del espécimen control.

DOCA

Los resultados individuales de supresión con 20 mgr. DOCA en sujetos normales están indicados en Tabla (37). La media de concentración de aldosterona en especímenes control fué de 18.88 ng% y en los especímenes post-supresión de 10.08 ng% siendo el porcentaje medio un 51.24% del control.

En la Tabla (38) están indicados los resultados de los dos controles en los que se prosiguió la supresión con DOCA 10 mgr. cada 12 h. durante 3 días indicándose los resultados individuales para cada día de supresión.

En figura (12) se expresa el efecto de supresión de aldosterona plasmática en sujetos normales utilizando DOCA (5 sujetos), 10 mgr. 1M cada 12 horas, 2 dosis o 9- α Fluorcortisol (4 sujetos) 0.1 mgr. vía oral cada 6 horas, 4 dosis.

Considerando el valor control como 100%, el valor medio post-supresión (\pm E.E.) se expresa como porcentaje del control.

ii - Resultados de supresión con mineralocorticoides en enfermos con hiperaldosteronismo secundario.

Fluorinef

Los resultados individuales en los cuatro enfermos estudiados están representados en Tabla (39), donde también se incluyen los resultados del estudio de secreción de aldosterona en 24 h. pre- y post-supresión y también los resultados individuales de actividad de renina plasmática antes y después de la maniobra de supresión.

DOCA

Los resultados individuales de los tres enfermos estudiados están indicados en Tabla (40) incluyendo también los valores de secreción de aldosterona en 24 h. control y post-supresión y también los resultados individuales de actividad de renina plasmática antes y después de la maniobra de supresión. En la figura (13) están representados los valores de supresión obtenidos con 9 α FF o DOCA en los casos de hiperaldosteronismo secundario comparándolos con los obtenidos en los casos primarios.

iii - Resultados de supresión con mineralocorticoides en enfermos con hiperaldosteronismo primario.

Los resultados individuales de los enfermos incluidos en el grupo Fluorinef o en el grupo DOCA están indicados en Tabla (41). En las tablas se incluye el diagnóstico individual postoperatorio. En la enferma I.L. se encontró hiperplasia modular bilateral además de un adenoma bien defluido en la suprarrenal izquierda.

En la Tabla (42) están indicados los resultados obtenidos en el estudio de cateterización bilateral de vena suprarrenal en seis de los enfermos con hiperaldosteronismo primario.

En enferma E.L. este estudio no fué realizado.

En la Figura (14) se expresa la supresión de niveles de aldosterona en los siete enfermos con hiperaldosteronismo primario y de los siete con secundario indicando la media de los grupos DOCA y 9 α FF.

	Presupresión 8 AM. Decubito Aldo. ng./100ml.	Postsupsión 8 AM. Decubito 0,4mg. Fluorinef Aldo. ng./100ml.	% del control $\frac{\text{Postsupr.}}{\text{Presupr.}} \times 100$
P.S.	11,5	7,6	66,09%
G.H.	11,4	10,01	88,60%
M.G.	7,1	6,3	88,73%
J.D.	14,2	6,2	43,66%
Media. =	11,05	7,55	X = 71,77%
E.E.	1,46	0,88	10,77
D.E.	2,93	1,76	21,55

TABLA 36

Supresión de niveles plasmáticos de Aldosterona en sujetos normales utilizando 0,4mg. de 9- α -Fluorocortisol vía oral en 24 horas.

	<u>Presupresión</u> 10 AM. Ambulat. Aldo. ng./100ml.	<u>Postsupsesión</u> 10 AM. Ambulat. 20 mg. DOCA. Aldo. ng./100ml.	<u>% del control</u> $\frac{\text{Postsupr.}}{\text{Presupr.}} \times 100$
M.G.	13,7	2,5	18,25%
A.G.	20,0	6,4	32,00%
R.Y.	21,7	12,5	57,60%
D.W.	23,0	17,3	75,22%
R.D.	16,0	11,7	73,13%
Media =	18,88	10,08	51,24%
E.E.	1,75	2,56	11,3
D.E.	3,9	5,73	25,26

TABLA 37

Supresión de niveles plasmáticos de Aldosterona en sujetos normales utilizando Acetato de 11-Desoxicorticosterona (DOCA) 20 mg. vía intramuscular en 24 horas.

	M.G.		A.G.	
	<u>ALDOSTERONA ng/100 ml.</u>	<u>RENINA ng/100ml.</u>	<u>ALDOSTERONA ng/100ml.</u>	<u>RENINA ng/100ml.</u>
Día-0 Presupresión	13,7	152	20,0	261
Día-1 20 mg. DOCA	2,5	139	6,0	257
Día-2 40 mg. DOCA	4,2	150	4,6	142
Día-3 60 mg. DOCA	2,4	90	5,6	129
Día-4 80 mg. DOCA	1,9	< 50	4,3	96

TABLA 38

Resultados en niveles plasmáticos de Aldosterona y renina de la administración de DOCA 20 mg./día durante cuatro días en dos sujetos normales.

u'eto	Edad	Sexo	Tasa de secreción aldosterona control $\mu\text{g}/24\text{h.}$	Tasa de secreción aldosterona post 9- α FF $\mu\text{g}/24\text{h.}$	Aldosterona plasmática control $\text{ng}/100\text{ml.}$	Aldosterona plasmática post 9- α FF $\text{ng}/100\text{ml.}$	% supresión de valor control	Renina plasmática control $\text{ng}/100\text{ml.}$	Renina plasmática post 9- α FF $\text{ng}/100\text{ml.}$
J.C.	39	M	187	115	16.7	13.1	78.4	195	150
S.P.	47	M	190	200	49.1	19.3	31.1	185	180
L.F.	38	M	940	386	9.1	5.7	62.3	200	128
J.D.	56	M	186	87	9.6	6.9	71.8	179	150

TABLA 39

Supresión con 9- α Fluorocortisol 0.4 mgr. en 24 horas en 4 pacientes con hiperaldosteronismo secundario.

Subjeto	Edad	Sexo	Tasa de secreción aldosterona control $\mu\text{g}/24\text{h.}$	Tasa de secreción aldosterona post DOCA $\mu\text{g}/24\text{h.}$	Aldosterona plasmática control $\text{ng}/100\text{ml.}$	Aldosterona plasmática post DOCA $\text{ng}/100\text{ml.}$	% supresión de valor control	Renina plasmática control $\text{ng}/100\text{ml.}$	Renina plasmática post DOCA $\text{ng}/100\text{ml.}$
C.B.	43	F	158	122	19.0	10	52.6	180	170
T.Q.	31	M	340	165	26.9	8.1	30.1	333	100
L.P.	36	F	192	44	25.2	6.6	26.1	248	103

TABLA 40

Supresión con DOCA .20 mg. en 24 horas en 3 pacientes con hiperaldosteronismo secundario

Sujeto	Edad	Sexo	Mineralo- corticoide	Diagnóstico	Tasa secreción aldosterona		Aldosterona plasmática post supresión		Renina plasmática post supresión	
					control	post supresión	control	post supresión	control	post supresión
					µg/24h.	µg/24h.	ng/100ml.	ng/100ml.	ng/100ml.	ng/100ml.
F.G.	32	F	9-α FF	Adenoma	200	147	7.9	5.5	< 50	< 50
A.M.	52	F	9-α FF	Adenoma	283	368	8.4	10.4	52	< 50
M.B.	41	F	9-α FF	Adenoma	167	116	39.4	38.2	< 50	55
G.P.	42	M	DOCA	Adenoma	455	--	44.7	42.1	65	66
I.L.	52	F	DOCA	Adenoma + Hiperplasia bilateral	342	345	35.8	40.5	< 50	< 50
E.L.	34	F	DOCA	Hiperplasia bilateral	230	233	20.8	27.4	< 50	< 50
R.W.	29	M	DOCA	Hiperplasia bilateral	290	310	23.0	17.8	60	< 50

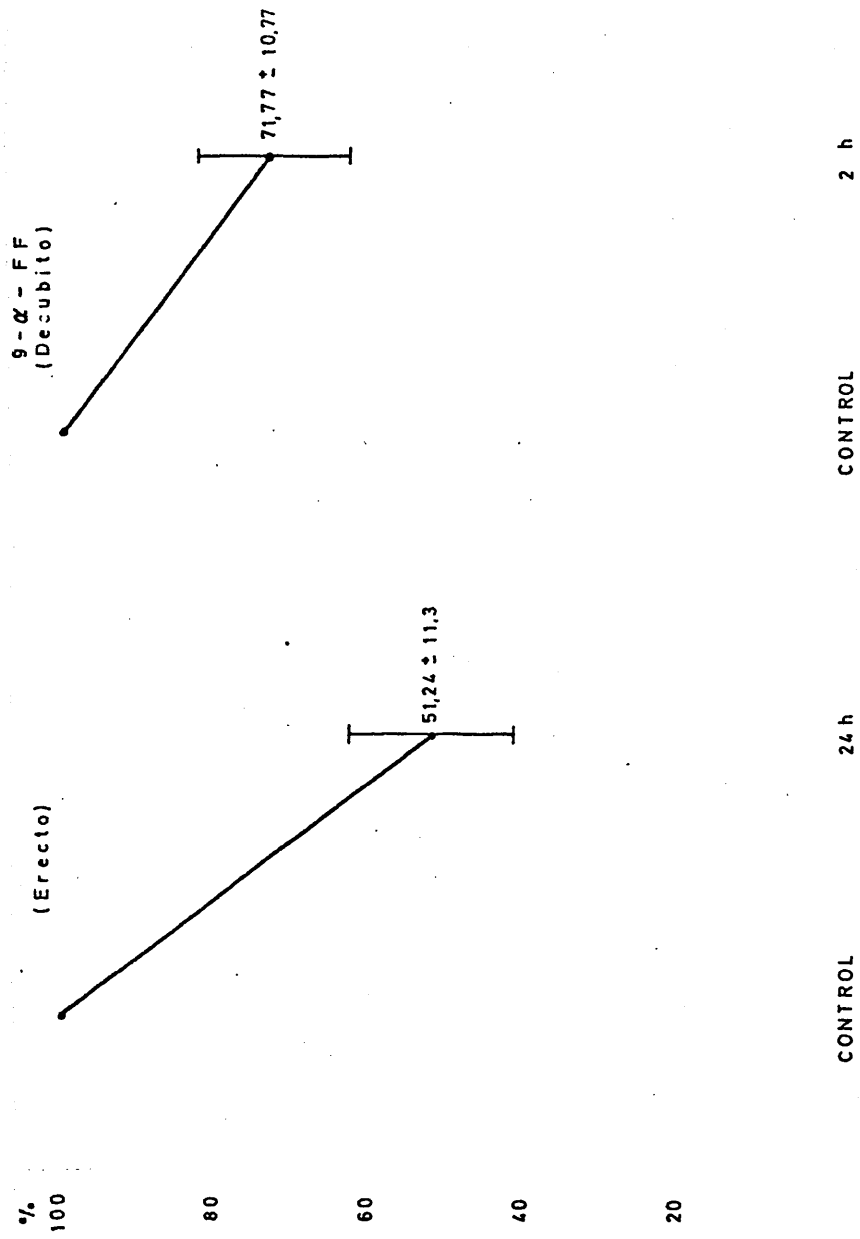
TABLA 41

Supresión con 9-α Fluorocortisol 0.4 mgr. en 24 horas o DOCA 20 mgr. en 24 horas en 7 enfermos con hiperaldosteronismo primario.

	G.P.⊙		I.L.		R.W.	F.G.		A.M.		M.B.		
	Adenoma izquierdo	Adenoma izquierdo + hiperplasia bilateral	hiperplasia bilateral	adenoma izquierdo		adenoma izquierdo	adenoma izquierdo	adenoma izquierdo	adenoma izquierdo	adenoma izquierdo	adenoma izquierdo	
	Cortisol $\mu\text{g}\%$	Aldo. $\mu\text{g}\%$	Cortisol $\mu\text{g}\%$	Aldo. $\mu\text{g}\%$	Cortisol $\mu\text{g}\%$	Aldo. $\mu\text{g}\%$	Cortisol $\mu\text{g}\%$	Aldo. $\mu\text{g}\%$	Cortisol $\mu\text{g}\%$	Aldo. $\mu\text{g}\%$	Cortisol $\mu\text{g}\%$	Aldo. $\mu\text{g}\%$
ntrol												
na izquierda	43	0.72	197	1.03	67	0.98	--	1.71	99	3.06	406	5.01
na izquierda												
st Angiotensina	28	1.44	789	3.94	1500	1.37	--	1.57	--	--	188	8.7
na izquierda												
st ACTH	320	1.63	1120	6.21	1300	0.21	--	0.04	1148	17.7	1061	11.29
ntrol												
na derecha	83	0.07	743	1.59	81	0.042	--	0.18	73	1.65	469	1.32
na derecha												
st Angiotensina	42	0.08	760	3.28	935	0.71	--	0.26	--	--	194	1.94
na derecha												
st ACTH	428	0.22	121	0.58	1065	0.16	--	0.46	3530	3.56	--	2.37

TABLA 42

Estudio de niveles de aldosterona en plasma de venas suprarrenales en seis enfermos con hiperaldosteronismo primario.



29
33
63

FIG. 12

SUPRESION DE ALDOSTERONA PLASMATICA EN SUJETOS NORMALES POR LOS MINERALOCORTICOIDES DOCA (5 SUJETOS), 10 mg s. I.M. CADA 12 HORAS 9-α-FLUOROCORTISOL (4 SUJETOS), 0.1 mg. CADA 6 HORAS. CON EL VALOR CONTROL 100 %. EL VALOR MEDIO DESPUES DE LA SUPRESION (± E.E.) ES EXPRESADO EN RELACION AL VALOR CONTROL.

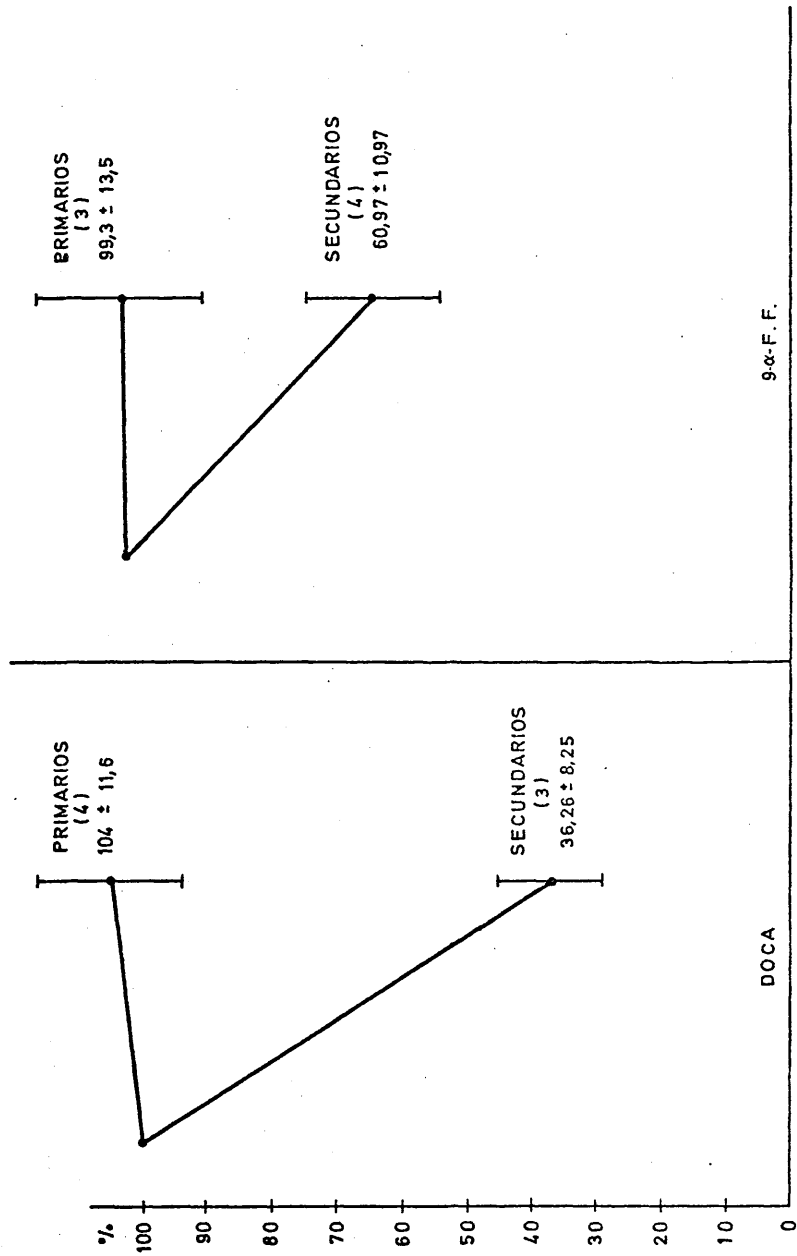


FIG. 13

COMPARACION DE SUPRESION DE ALDOSTERONA PLASMATICA EN HIPERALDOSTERONISMOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS UTILIZANDO DOCA O 9-α-F.F. CON EL VALOR CONTROL COMO 100%. SE EXPRESA EL VALOR MEDIO DESPUES DE LA SUPRESION (± E.E.) EN RELACION AL VALOR CONTROL.

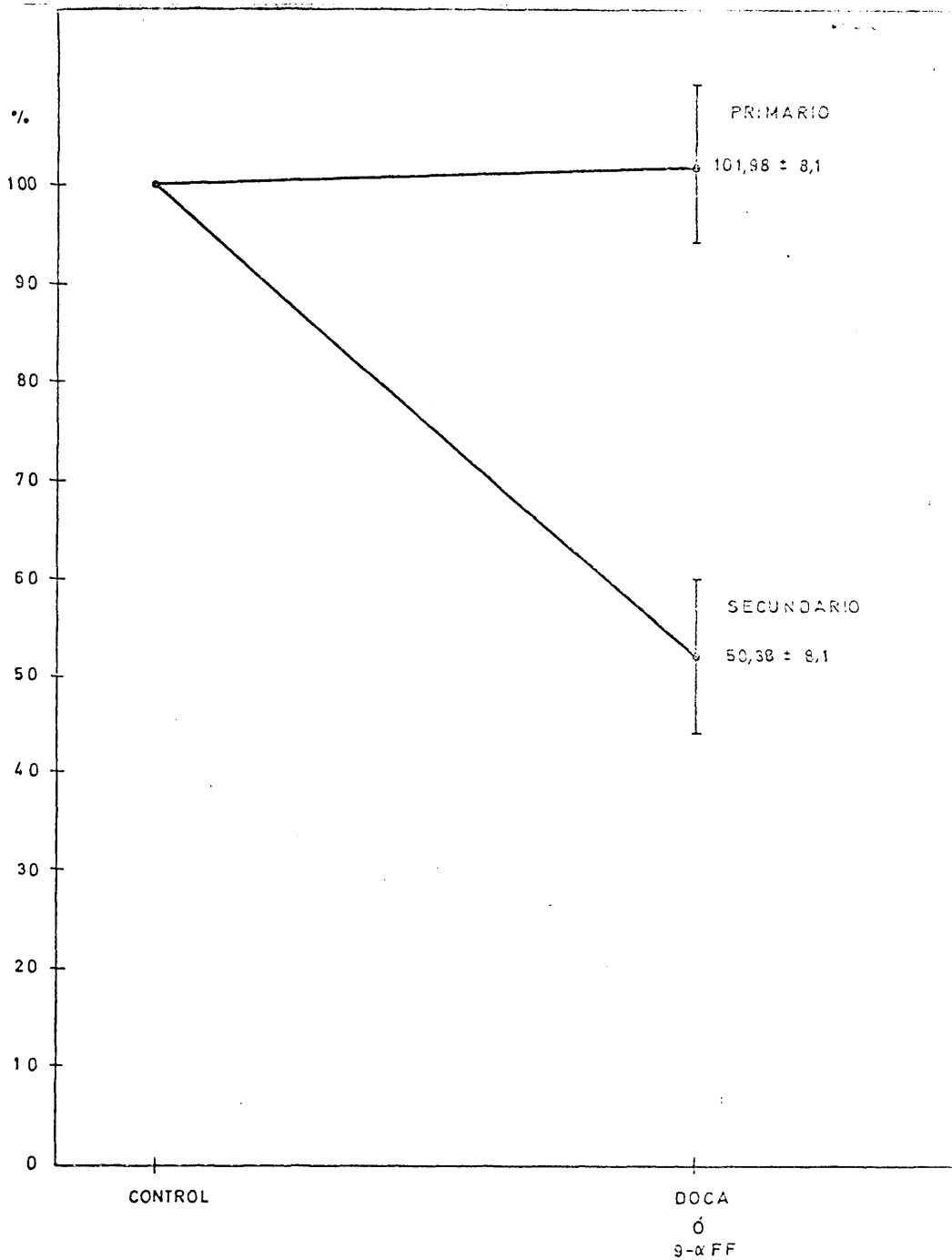


FIG. 14

SUPRESION DE NIVELES DE ALDOSTERONA EN 7 PACIENTES CON HIPERALDOSTERONISMO PRIMARIO Y 7 CON HIPERALDOSTERONISMO SECUNDARIO. LAS DOSIS FUERON, DOCA 10 mgs. I.M. CADA 12 HORAS DURANTE 24 HORAS Ó 9-α FLUOROCORTISOL, 0,1 mg. CADA 6 HORAS DURANTE 24 HORAS. CON EL VALOR CONTROL COMO 100%. EL VALOR MEDIO DESPUES DE LA SUPRESION (± E) ES EXPRESADO EN RELACION AL VALOR CONTROL.

B-3 Estudios de regulación de niveles plasmáticos de Aldosterona en pacientes anefricos.

Todos los enfermos incluidos en este estudio eran sujetos sometidos a nefrectomía bilateral como preparación para trasplante renal, y mantenidos en hemodialisis crónica.

El tiempo desde la primera dialisis y el estudio varió entre 3 y 20 semanas y fueron sometidos a nefrectomía bilateral entre 1 y 12 semanas previamente al estudio.

Los enfermos recibieron 1.5 mgr/Kgr de heparina en dos dosis separadas por tres horas durante el tiempo de hemodialisis. Los enfermos fueron dializados tres veces por semana.

En la Tabla (43) se indica la edad, sexo, duración de hemodialisis y tiempo desde la nefrectomía bilateral individualmente para cada enfermo.

Previamente se estudió un segundo grupo de 4 enfermos anefricos mediante cateterización de vena suprarrenal. Los enfermos en este grupo fueron mantenidos también en las mismas condiciones de hemodialisis crónica y administración intermitente de heparina en la misma dosis que el grupo primero. Este estudio de cateterización fué hecho antes de haber desarrollado el método de R.I.E. por lo que los valores de aldosterona fueron determinados por el método de Tait.

a - Protocolos Clínicos.

i - Estudio postural y depleción volumen.

Se estudiaron seis sujetos anefricos. Durante hemodialisis la depleción de volumen se obtuvo mediante ultrafiltración durante hemodialisis. Los enfermos fueron mantenidos en posición decubito durante todo el estudio de depleción siendo el tiempo máximo de hemodialisis de seis horas.

La comprobación de la depleción de volumen se realizó comparando el peso corporal antes y después de la dialisis siendo la diferencia el equivalente a la depleción de volumen.

Las pérdidas individuales de peso corporal están indicadas en Tabla (44) y variaron entre 1/2 y 3 lbs.

Especímenes de plasma periférico para la determinación de concentración de aldosterona fueron obtenidos inmediatamente antes de comenzar la hemodialisis e inmediatamente después de finalizada ésta.

Los estudios posturales fueron realizados 1 a 4 días después del estudio de depleción de volumen y en todos los enfermos este estudio fué realizado al día siguiente de un período de hemodialisis.

Los enfermos fueron mantenidos en posición supina desde 10 P.M. del día anterior hasta las 8 A.M. del día del estudio cuando se obtuvo un espécimen de plasma periférico para la determinación

de concentración de aldosterona y actividad de renina plasmática.

Entonces los enfermos permanecieron en postura erecta durante dos horas cuando se obtuvo otro espécimen de plasma periférico.

ii - Protocolo estudio de cateterización vena adrenal y estimulación.

Los estudios de cateterización de vena suprarrenal fueron realizados en cuatro enfermos realizando cateterización unilateral (izquierda) y midiendo concentración de aldosterona en los especímenes de plasma de vena adrenal. El protocolo de cateterización e infusión de ACTH o angiotensina han sido descritos en la sección de métodos generales de los estudios clínicos (pág. 172).

Tres enfermos fueron estudiados mediante estímulo postural utilizando una tabla de balanceo durante el estudio de cateterización colocando la tabla en posición de 45° durante 10 minutos cuando se obtuvo un segundo espécimen. Se estudiaron tres enfermos mediante infusión de ACTH obteniéndose especímenes de plasma de vena suprarrenal antes y después de la infusión. En un enfermo se estudió el efecto de infusión subpresora de angiotensina obteniéndose igualmente un espécimen antes y después de la infusión.

b - Resultadosi - Respuesta a depleción isonatremica de volumen.

Los resultados individuales están indicados en Tabla (44).

La ultrafiltraron durante la hemodialisis resultó en una pérdida de peso corporal, equivalente a la depleción aguda de volumen, variable entre 1/2 a 3 lbs. pero no se observó ninguna elevación significativa en los niveles plasmáticos de aldosterona como respuesta a la depleción de volumen. Sólo un enfermo (J.E.) tuvo una elevación de 1.41 a 3.50 ng%.

La concentración de sodio en plasma periférico se mantuvo constante y en tres de los enfermos la concentración de potasio serico estaba significativamente elevada antes de la hemodialisis y los valores volvieron a los límites normales al terminar la dialisis.

Los niveles de aldosterona plasmática permanecieron por debajo de los valores normales durante todo el estudio.

En la figura (15) se representan los valores individuales antes y después de la depleción isonatremica de volumen.

ii - Respuesta al estímulo postural

Los resultados individuales están indicados en la Tabla (45). La actividad de renina plasmática

fué detectada solamente en dos sujetos sin cambiar de manera significativa con postura erecta.

En sujetos normales los valores obtenidos con el radioinmunoensayo descrito en la primera parte de este trabajo muestran un aumento de 200 a 506% de concentración de aldosterona plasmática por el estímulo de 2 horas en posición erecta. (Ver página (178).)

Como puede verse en la Tabla (45) en los sujetos anefricos no hubo ninguna elevación significativa en la concentración plasmática de aldosterona como respuesta al estímulo postural. La mayor elevación es observada en el enfermo E.M. aunque por debajo de la elevación observada en sujetos normales control. (Ver página (178).)

En la figura (16) están representadas las respuestas al cambio postural en los sujetos anefricos comparándolas con la media de los cambios producidos en nueve sujetos normales sometidos al mismo estudio.

iii - Resultados estudio cateterización.

En la figura (17) están indicados los resultados obtenidos en el estudio postural realizado en tres enfermos anefricos mediante la medida de concentración de aldosterona en plasma de vena adrenal izquierda.

Después de diez minutos en posición semierecta a 45° los valores de aldosterona no cambian significativamente de los valores control. En un enfermo

ambos valores estaban por debajo de la sensibilidad del método utilizado de Tait ($<0.5 \mu\text{g}\%$).

Los resultados del estudio de estimulación con ACTH en tres enfermos están indicados en la figura (18). Los tres enfermos tuvieron un aumento significativo en la concentración de aldosterona en plasma de vena adrenal

Un enfermo fué estudiado con infusión subpresora de angiotensina. En este enfermo el valor basal de aldosterona en rena adrenal era de $0.53 \mu\text{g}\%$. Después de cinco minutos de infusión subpresora de angiotensina la concentración de aldosterona aumentó a $1.21 \mu\text{g}\%$. (Fig. 19)

	<u>Edad</u>	<u>Sexo</u>	<u>Tiempo Nefrectomia (Semanas)</u>	<u>Duración Hemodialisis (Semanas)</u>
J.E.	37	M	12	20
S.W.	24	F	4	6
L.G.	30	M	1	3
E.M.	24	F	8	11
K.W.	28	M	4	8
M.A.	25	M	1	9
T.S.	40	F	8	6

TABLA 43

Resumen de los siete sujetos anefricos estudiados.

Peso Corporal Perdido Durante Dialisis (gr.)	P R E D I A L I S I S				P O S T D I A L I S I S			
	Aldosterona Plasmática ng/100ml.	Sodio Plasmático mEq/L.	Potasio Plasmático	Potasio Plasmático	Aldosterona Plasmática ng/100ml.	Sodio Plasmático mEq/L.	Potasio Plasmático	Potasio Plasmático mEq/L.
J.E.	1.4	143	6.1	6.1	3.5	141	4.3	
S.W.	0.1	136	4.3	4.3	0.3	131	3.9	
L.G.	1.4	139	6.1	6.1	< 1 ng.	135	4.5	
E.M.	2.1	139	5.8	5.8	1.3	137	4.2	
K.W.	5.0	147	7.4	7.4	1.9	141	5.0	
M.A.	2.0	142	5.2	5.2	1.2	137	4.6	

TABLA 44

Efecto de depleción isonatremica de volumen en concentraciones plasmáticas de Aldosterona, sodio, potasio y en peso corporal.

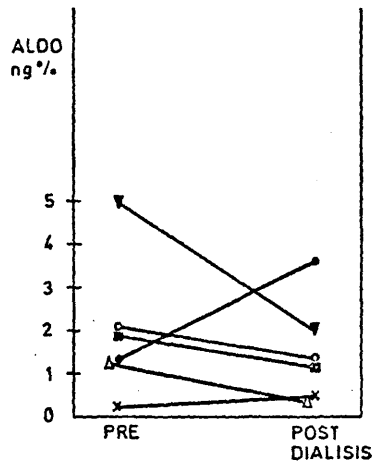
S U P I N O

E R E C T O (2 h .)

	Aldosterona Plasmática ng/100ml.	Sodio Plasma mEq/L.	Potasio Plasma mEq/L.	Actividad Renina Plasmática ng/100ml.	Aldosterona plasmática ng/100ml.	Sodio Plasma mEq/L.	Potasio Plasma mEq/L.	Actividad Renina Plasmática ng/100ml.
J.E.	3.8	138	4.5	< 50	1.99	134	4.4	< 50
S.W.	4.5	138	4.3	71	0.7	139	4.4	< 50
L.G.	0.4	138	5.4	62	1.2	139	5.3	65
E.M.	5.6	137	4.9	< 50	10.7	135	4.8	< 50
K.W.	3.7	131	4.3	< 50	4.0	131	4.4	< 50
M.A.	1.7	136	4.3	< 50	0.73	134	4.3	< 50
MEDIA	3.28				3.22			

TABLA 45

Efecto de cambio postural en los niveles plasmáticos de Aldosterona, sodio, potasio y actividad de Renina en 6 sujetos anefricos.



- J.E
- ▲ L.G
- x S.W
- E.M
- M.A
- ▼ K.W

FIG. 15

EFFECTO DE DEPLECIÓN ISONATREMICA DE VOLUMEN EN LA CONCENTRACION PERIFERICA DE ALDOSTERONA EN 6 SUJETOS ANEFRICOS.

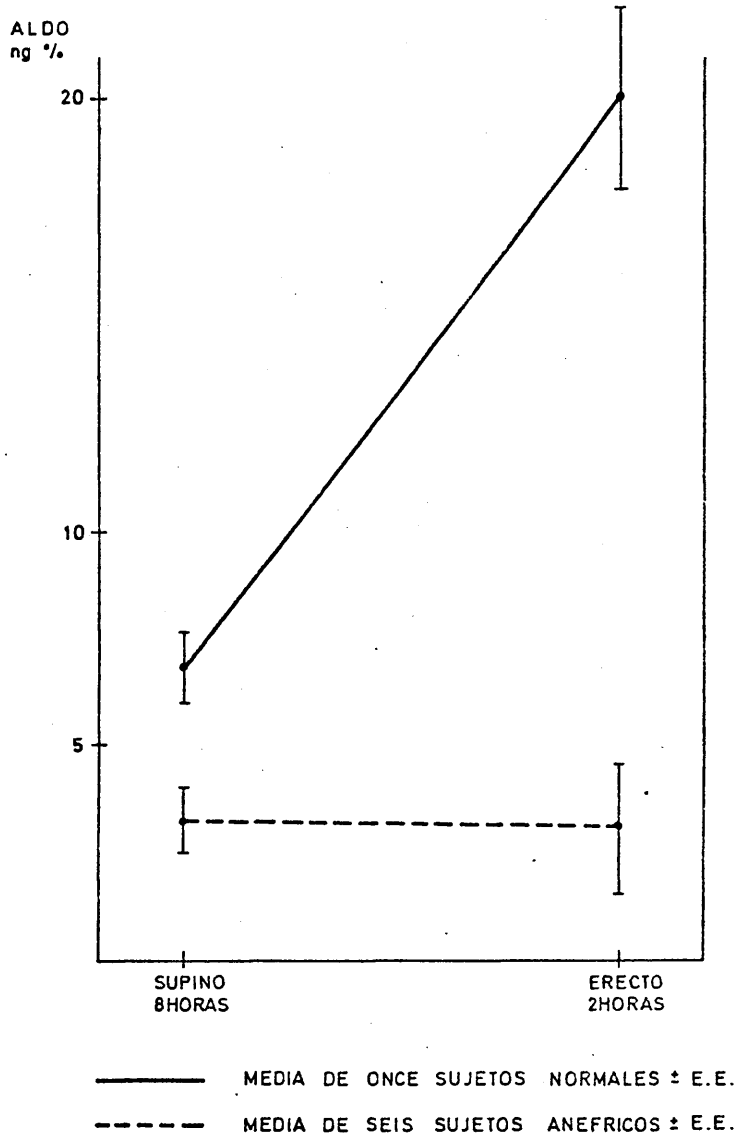


FIG. 16

EFFECTO DE POSICION ERECTA DURANTE 2 HORAS EN LOS NIVELES PLASMATICOS DE ALDOSTERONA EN SEIS SUJETOS ANEFRICOS COMPARANDOLO CON EL EFECTO OBTENIDO EN ONCE SUJETOS NORMALES.

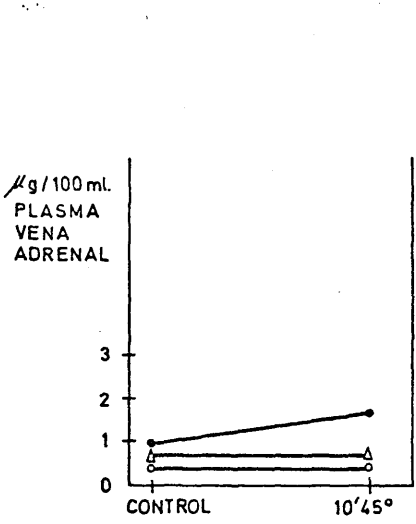


FIG. 17

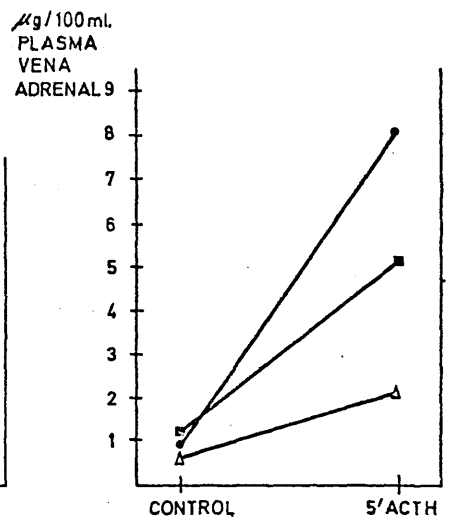


FIG. 18

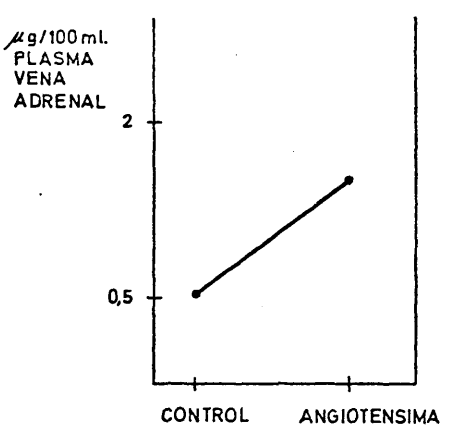


FIG. 19

FIG. 17 EFECTO DE CAMBIO POSTURAL EN LA CONCENTRACION DE ALDOSTERONA EN PLASMA DE VENA ADRENAL EN TRES SUJETOS ANEFRICOS.

FIG. 18 EFECTO DE INFUSION DE ACTH EN LA CONCENTRACION DE ALDOSTERONA EN PLASMA DE VENA ADRENAL EN TRES SUJETOS ANEFRICOS

FIG. 19 EFECTO DE INFUSION SUBPRESORA DE ANGIOTENSINA EN LA CONCENTRACION DE ALDOSTERONA EN PLASMA DE VENA ADRENAL EN UN SUJETO ANEFRICO.

DISCUSION DE RESULTADOS

Discusión de Resultados.1 - Método de determinación de la concentración de aldosterona en plasma periférico por radioinmunoensayo.

En el desarrollo del radioinmunoensayo hemos estudiado las propiedades de dos tipos de antisuero obtenidos, anti-aldosterona y antialdosterona-lactona. El antisuero anti-aldosterona-lactona fué preparado creyendo que la lactonización de la molecula de aldosterona daría una mayor especificidad a los anticuerpos y que además en el proceso de purificación de la aldosterona se evitaría su degradación al manipular una molecula más estable como es el derivado lactónico.

Como puede deducirse de los resultados de los estudios de especificidad, los dos anticuerpos son comparables respecto a la identificación de aldosterona o aldosterona-lactona respectivamente. Por otra parte la manipulación de aldosterona no lactonizada no produce degradación de la molecula si se siguen las condiciones de trabajo que hemos indicado utilizando disoluciones acuosas de etanol para evitar la formación de hemiacetal y conservando las disoluciones a -4° durante su almacenamiento. Como ya hemos indicado anteriormente, el protocolo inicial proyectado consistía en la utilización del antisuero anti-lactona con lo cual el método era excesivamente laborioso ya que era necesario realizar una cromatografía previa a la lactonización de la molecula de aldosterona. La oxidación por otra parte, debía realizarse en un período de doce horas teniendo además que realizarse en una etapa posterior

y previa al radioinmunoensayo una nueva purificación con una segunda cromatografía. Además con este método obtuvimos blancos elevados del orden de 30-40 pg. debidos probablemente a interferencia de restos del agente oxidante que eran muy difícil de eliminar. Estos inconvenientes, junto con el hallazgo de una similar especificidad del antisuero antialdosterona, nos llevó al desarrollo de un método utilizando este antisuero siendo el resultado final del estudio el protocolo definitivo descrito.

En el estudio de los métodos de purificación hemos definido las condiciones óptimas de extracción con CH_2Cl_2 y de partición comparando distintos métodos.

La simplicidad del método definitivo de extracción y partición hace el método útil para el proceso de multiples especimenes simultaneamente.

Creemos que una de las características más interesante de nuestro método consiste en el desarrollo de un sistema único de cromatografía en capa fina que permite la separación de aldosterona de otros esteroides.

La dificultad de dicha separación en un solo sistema de capa fina es evidente en vista de que se ensayaron 54 sistemas antes de desarrollar el definitivo. No hemos incluido en la parte experimental la descripción y los resultados obtenidos con estos sistemas. Todos ellos estaban basados en soporte de Celite y propilenglicol, Tolueno, diclorometano, etilenoglicol, acetona, éter y benceno en distintas concentraciones y proporciones con distintas preinpregnaciones de la placa cromatográfica.

El sistema cromatográfico ideado es muy rápido pues se completa en 90 minutos lo cual es una ventaja significativa con los sistemas cromatográficos en papel mucho más lentos y laboriosos.

La elución del esteroide previa al radioinmunoensayo utilizando microcolumnas es muy rápida pues bastan aproximadamente unos cinco minutos para cada espécimen.

El sistema de separación de las fracciones libre y unida es muy simple y la introducción en los cálculos finales del factor corrector para la fracción libre no adsorbida en el carbón activado aumenta la precisión del método.

El antisuero utilizado es de una gran especificidad y de título elevado. Estas dos características han sido aumentadas favorablemente mediante la adición de proteína inerte a la dilución de antisuero, permitiendo el uso de diluciones 1:400.000 lo cual permite la utilización de pequeñas cantidades de antisuero para un elevado número de medidas.

Aunque existe cierta reacción cruzada del antisuero con otros esteroides, el proceso de separación de la Aldosterona hace que este hecho no tenga consecuencias. La especificidad del método viene indicada por los valores encontrados en los blancos reactivo, blancos de plasma pre extractado y blancos de plasma adrenalectomizado, todos ellos en el mismo bajo nivel de 2 a 5 pg. Para conseguir estos valores tan bajos de blanco, es necesario seguir las precauciones en el manejo y limpieza del material que hemos indicado en la descripción experimental. Una precaución adicional en la evitación de contaminación extraña en caso de obtener

blancos elevados consiste en lavado con diclorometano del material de vidrio utilizado justo antes de su uso.

La comparación del método con los hasta ahora existentes de dilución doble isotópica resalta las ventajas del radioinmunoensayo pues su sencillez permite múltiples determinaciones simultáneas. Con el método de radioinmunoensayo descrito puede determinarse simultáneamente unos catorce especímenes por una sola persona lo cual es absolutamente imposible con cualquiera de los métodos doble isotópicos.

Además en los métodos doble isotópicos los blancos son mucho más elevados que los obtenidos con el radioinmunoensayo debido a una mayor inespecificidad.

Por otra parte y debido a las múltiples cromatografías necesarias en los métodos doble isotópicos, las pérdidas de aldosterona son mucho mayores, recobrando al final del procedimiento un 30-35% de la aldosterona inicial mientras que con nuestro radioinmunoensayo la aldosterona recobrada es un 86% de la cantidad inicial. Aunque en ambos métodos se corrigen las pérdidas, cuanto menores sean estas, mayor será la exactitud de los cálculos finales.

Como ya hemos indicado en la introducción a los métodos de medición de aldosterona, las técnicas de cromatografía de gases incluso con detector de captura de electrones, no son suficientemente específicas ni sensibles como para la determinación de las mismas concentraciones de aldosterona en plasma periférico, lo cual viene indicado por los múltiples intentos realizados para la determinación

por este método (146-147-148) . y con los cuales sólo se ha logrado determinar de una manera práctica concentraciones muy por encima de las plasmáticas y sólo aplicables a las determinaciones de aldosterona in vitro en medios de incubación de suprarrenales (146).

Solamente Nicolís ha descrito un método de determinación de aldosterona periférica por cromatografía de gases con detección de captura de electrones (144) en el que, debido a la inespecificidad del detector de captura, es necesario realizar, después de una extracción y partición, la lactonización de la molécula, cromatografía, formación de un heptafluorobutirato, y una segunda cromatografía antes de realizar la cromatografía en fase gaseosa. Todo ello conduce a un 34% de aldosterona recobrada y a unos blancos elevados que hace el método inferior a los doble isotópicos compitiendo en complicación con estos.

Comparación con valores normales determinados con técnicas de doble dilución isotópica.

Como ya se ha indicado antes, el único método utilizado en la determinación sistemática de aldosterona plasmática hasta ahora, han sido las técnicas de doble dilución isotópica.

Simultáneamente al desarrollo del presente método de radioinmunoensayo, en otros dos laboratorios se han desarrollado otras técnicas de radioinmunoensayo para la determinación de aldosterona.

En la Tabla (46), se comparan los valores basales obtenidos con técnicas de dilución isotópica y los valores obtenidos con el método de radioinmunoensayo descrito en este trabajo.

Fraser y James (259), encuentran por su método doble isotópico unos valores normales de 5 - 17 ng%, en sujetos sin control de dieta y en especímenes obtenidos a distintos tiempos no especificados, a lo largo del día. Tampoco especifica la posición en que fueron obtenidos los especímenes.

Describen los valores obtenidos por el mismo método en pacientes con el síndrome de hiperaldosteronismo primario, siendo estos de 11-145 ng%.

Coghlan y Scoggins (1967) según su método doble isotópico (154), obtienen en sujetos normales en decubito y en dieta de 80-120 MEq Na/día, un valor medio de $5.8 \text{ ng\%} \pm 45 \text{ D.E.} \pm 0.9 \text{ E.E.}$

Nowaczrndky, Silah y Genest (260), también con una técnica doble isotópica, obtienen unos valores normales de 2-18 ng%.

Brodie y Tait (153) con su método de doble dilución isotópica, basado como los anteriores en el uso de H^3 -anhidrido acético como reagente marcados, obtienen en sujetos no sometidos a dieta específica y en posición sentada, una media de 6.96 ± 4.05 D.E. ± 1.35 E.E.

Wolf et al. (261) han descrito un método doble isotópico similar, aunque utilizando C^{14} anhidrido acético y describen unos valores normales de 7-59 ng%, con un valor medio de 22 ng%.

Bayarel et al. (262), utilizando un método doble isotópico similar a los descritos por Brodie et al. y Coghlan et al., obtiene en normales, en posición erecta, unos valores de 5.8 - 17.0 ng%, con un valor medio de 11.5.

Otro procedimiento hasta ahora utilizado para la medición de aldosterona en plasma periférico, ha sido el cálculo indirecto de su concentración, a partir de la medición de la secreción en 24 h. y el aclaramiento metabólico.

Con este procedimiento indirecto, Peterson et al. (151) obtienen unos valores normales de 2-15 ng%, Tait et al. (150) de 3-15 ng%, Kono et al. (263) de 6-9 ng% y Vecsey et al. (264) de 3.5 - 12.2 ng%.

En la Tabla (46) se expresan estos resultados, comparándolos con los obtenidos con el método de radioinmunoensayo descrito. La mayoría de los autores no describen la metodología utilizada en la obtención de estos valores en sujetos normales, por lo que se explican algunas de las discrepancias y amplios márgenes, ya que como hemos visto hasta ahora y como se describirá a continuación, los niveles de aldosterona plasmática están sometidos a gran variabilidad, según el grado de estímulo del sistema renina-

angiotensina y además, existe una posible variación diurna, por lo cual los valores sólo son comparables cuando son obtenidos en situación postural y tiempo biológico semejantes. Aún a pesar de las distintas condiciones, puede comprobarse que los resultados obtenidos con el método de radioinmunoensayo son similares a los hasta ahora encontrados con los métodos directos de doble dilución isotópica, o los calculados indirectamente a partir de la tasa de secreción y aclaramiento metabólico.

Simultáneamente al desarrollo de nuestro método, se ha logrado en otros dos laboratorios la medición de aldosterona plasmática mediante radioinmunoensayo. Estos dos métodos son los de D. Mayes et al. (265) y F. Bayard et al. (266). Mayes utiliza un antisuero obtenido en conejo por medio de un conjugado de aldosterona alúmina y Bayard obtiene el antisuero también de conejo de manera similar.

Comparando estos dos métodos con el desarrollado simultáneamente por nosotros, los resultados del método indican que la especificidad del método descrito por nosotros es muy superior a la del método de Bayard que obtiene unos blancos reagente y de plasma de adrenalectomizado muy superiores a los obtenidos por nosotros, siendo el coeficiente de variación en análisis repetidos del mismo plasma también superior al de nuestro método.

La especificidad del método descrito por Bayard es similar a la obtenida por nosotros con unos blancos reagente ligeramente inferiores, pero con blancos de plasma adrenalectomizado superiores a los obtenidos por nosotros.

Las pérdidas medias de aldosterona durante el procedimiento son en ambos métodos superiores a las del nuestro

ya que en el de Bayard la aldosterona recobrada es un 66.3% y en el de Mayes 77.0%, mientras que en el nuestro es 85.81%.

Donde creemos que existe una mayor ventaja de nuestro método sobre los otros dos, es en la simplicidad y rapidez metodológica, cualidades que destacan a todo radioinmunoensayo frente a otros posibles métodos analíticos.

El método de Bayard et al. que ya hemos visto, es de especificidad y precisión inferior al descrito por nosotros, se utiliza para la purificación de aldosterona un sistema cromatográfico en papel que además de ser más lento y técnicamente laborioso que la cromatografía en capa fina utilizada en nuestro método, produce elevados blancos reagente como se indica en su descripción del método.

El método descrito por Mayes es el único con precisión y especificidad comparable al nuestro, aunque con el inconveniente de utilizar una cromatografía en columna de sílica gel, una cromatografía en papel y por último y para eliminar la posible contaminación del papel cromatográfico, es necesario realizar otra cromatografía en columna de sílica gel. Es pues evidente la simplificación que supone una cromatografía en capa fina frente a dos cromatografías en columna y una en papel.

METODOS DOBLE DILUCION ISOTOPICA

Fraser (1967) dieta libre	2 - 18 ng%
Coghlan (1967) 18-120 mEq Na Decubito	5.8 ng \pm 4.5 D.E.
Nowaczrnsky (1966)	2 - 18 ng%
Brodie (1967) dieta libre Decubito	6.96 \pm 4.05 D.E.
Wolf (1963)	7 - 59 ng%
Bayard (1970) Erecto	5.6 - 17 ng%

CALCULO INDIRECTO (Secreción - Aclaramiento)

Peterson (1964)	2 - 15 ng%
Tait (1961)	3 - 15 ng%
Balikian (1968) Decubito	2.6 ng%
Erecto	25 ng%
Kono (1964)	6 - 9 ng%
Vecsey (1969)	3.5 - 12 ng%

Método RIE descrito Decubito	4.5 - 10.5 m. 7.6
Erecto	9.5 - 33.0 m. 20.7
Variación media total	7.6 - 20.7

2 - Niveles plasmáticos de Aldosterona en sujetos normales.

Cambio postural, sobrecarga y depleción salina, variación diurna.

Cambio postural en sujetos normales.

En las condiciones de nuestro estudio hemos obtenido mediante el estímulo postural de dos horas en posición erecta, una media de 303% de elevación sobre los valores control en posición supina.

Es evidente en vista de estos resultados que los cambios posturales producen marcado aumento en la concentración periférica de aldosterona. Este grado de elevación en los niveles de aldosterona está de acuerdo con las elevaciones de 200 - 300% descritos por Wolff (261). La metodología utilizada por Wolff es similar a la nuestra efectuando el estímulo postural de manera ambulatoria, al contrario que Balikian et al. (212) que describen elevaciones mayores mediante el estímulo postural, pero realizando las medidas de aldosterona periférica mediante el estudio del aclaramiento de aldosterona necesitando para ello una infusión continua por lo que los sujetos estudiados tenían que permanecer en pie inmobilizados no siéndoles permitido sentarse como en nuestro protocolo. Estas diferencias metodológicas pueden explicar el mayor aumento observado por Balikian.

En nuestro trabajo hemos confirmado las observaciones de Balikian (212), Wolff (261) y Cohen (200), indicando un aumento en la producción de aldosterona con el consiguiente aumento en su concentración plasmática ante el

estímulo postural.

En nuestro estudio hemos utilizado el estímulo postural en la manera más fisiológica, es decir de manera ambulatoria, permaneciendo los sujetos control tanto sentados como en pie, considerándose este estímulo como suficiente ya que produce más de un 300% de aumento. Los niveles control en posición supina están de acuerdo con los valores publicados anteriormente y determinados por métodos doble isotópicos, así como con los resultados obtenidos simultáneamente a los nuestros en otros dos laboratorios por medio de radioinmunoensayo, como ya hemos comentado en la discusión de resultados del método.

Que el aumento de los niveles de aldosterona plasmática ante el estímulo postural es debido a un aumento de secreción, ha sido demostrado por Balikian (212) quien, midiendo cambios de secreción y aclaramiento metabólico de aldosterona con cambios posturales, concluye que los cambios en aclaramiento son mínimos.

El mecanismo de este aumento de producción es mediado por el sistema Renina-Angiotensina según la demostrado Cohen (200) indicando actividad de renina y excreción de aldosterona en sujetos sometidos al estímulo postural.

Bayard (267) recientemente ha publicado los resultados obtenidos en un grupo de sujetos normales sometidos a dieta alta o baja en sodio y la elevación de niveles de aldosterona periférica ante el estímulo postural es de un 200% en sujetos con depleción salina y 281% en los mismos voluntarios sometidos a sobrecarga salina.

Estudio de variación diurna-

En este estudio hemos querido analizar las posibles variaciones diurnas en la concentración plasmática de aldosterona en sujetos normales sometidos a régimen ambulatorio. Este estudio fue realizado con el fin de aplicar sus resultados al desarrollo del test de supresión con mineralocorticoides para averiguar si los especímenes controles necesitaban ser obtenidos a un tiempo determinado o la estabilidad de los niveles de aldosterona en régimen ambulatorio permitían su obtención en dicho régimen independientemente del tiempo.

Nuestros resultados indican un nivel medio más elevado de aldosterona a las 2 horas de permanecer en régimen ambulatorio con sucesivas elevaciones y disminuciones que dan como resultado el nivel medio más bajo de los obtenidos en régimen ambulatorio a las 12 del mediodía después de 4 horas en régimen ambulatorio, aunque el nivel medio menor es el obtenido a las 8 A.M. después de 8 horas en posición decubito. Después de mediodía encontramos una nueva elevación en los niveles de aldosterona hasta la última medida obtenida a las 8 P.M. Los pocos estudios sobre ritmo circadiano de aldosterona publicados hasta ahora, han sido realizados mediante estudios urinarios fraccionados de excreción de aldosterona por lo que son de difícil comparación.

En general concuerdan en el hecho de que en sujetos normales la excreción de aldosterona es mayor durante el día, particularmente en la primera parte del día.

De nuestro estudio no podemos extraer ninguna conclusión definida ya que no hemos realizado un suficientemente número de mediciones y por otra parte, el régimen ambulatorio y la falta de otros parámetros no nos permite concluir afirmativa o negativamente sobre la existencia de un ritmo circadiano, lo cual por otra parte quedaba fuera de nuestro propósito. De todas formas, de nuestros resultados parece deducirse que el estímulo postural es más efectivo en la mañana con una elevación más acusada entre los especímenes 8 A.M. y 10 A.M. Este resultado coincide con las observaciones de Gordon (246) quien midiendo actividad de renina plasmática comprueba que el cambio postural en la mañana tiene un mayor efecto sobre la elevación en la actividad de renina que en la tarde. Analizando sus resultados concluye que el hipotético mecanismo del ritmo circadiano de la producción de renina actuaría sinérgicamente con el estímulo postural por la mañana, siendo antagonista por la tarde.

Wolfe (245), estudiando excreciones fraccionadas de aldosterona, concluye que el mecanismo responsable de una posible variación diurna en la secreción de aldosterona, sería el efecto postural que sería mediado por el sistema renina angiotensina y que, al agotarse en el transcurso del día, originaría este descenso en la producción de aldosterona. Los resultados de nuestro estudio no son comparables ya que no hemos suprimido otros factores estimuladores como ACTH ni hemos comparado la situación ambulatoria con postura decubito durante el mismo período de tiempo, aunque la elevación observada por nosotros en los niveles determinadas a las 8 P.M. no coinciden con el descenso en excreción que Wolfe observa a esta misma hora, también en régimen ambulatorio.

En resumen, el estudio realizado no permite concluir sobre una real variación diurna en los niveles plasmáticos de aldosterona aunque parece indicar que el estímulo postural es limitado en el tiempo con máxima elevación de los niveles de aldosterona en las primeras horas de la mañana, una vez adaptada la postura erecta.

Las diferencias observadas durante el día en los niveles de aldosterona obligan a realizar cualquier estudio comparativo al mismo tiempo y con estímulo postural semejante.

Por otra parte, muy recientemente A. Michelakis y R. Horton (288) han publicado un estudio realizado en sujetos normales en el que, midiendo niveles plasmáticos de Aldosterona por un método doble isotópico, manteniendo a los sujetos en posición supina las 24 horas, encontraron niveles máximos de Aldosterona a las 6 A.M. y 12 P.M., siendo los valores a las 12 mediodía y 6 P.M. la mitad de los otros dos valores. Estos resultados concuerdan con los nuestros, indicando un progresivo descenso a lo largo del día con una nueva elevación hacia el final de las 24 horas independientemente del estímulo postural.

Sobrecarga y depleción salina.

Nuestros estudios en sujetos normales indican que la concentración de aldosterona plasmática está en relación con la ingestión de ClNa.

La sobrecarga salina producida mediante dieta elevada en sodio, deprime los niveles de aldosterona en un 38% del valor control, mientras que la depleción salina produce un aumento en la concentración de aldosterona plasmática de un 545% del valor control.

Los cambios en la concentración de aldosterona plasmática fueron más consistentes que los cambios en actividad de renina plasmática aunque existe concordancia general en dichos cambios. En el control R.S. se produjo una elevación de los niveles de aldosterona en el día 5 del experimento, con posterior descenso aunque el valor obtenido en el día de máxima depleción fue un 289% del valor control. Este aumento en el comienzo de la depleción salina se acompañó de un aumento en los niveles de renina por lo que suponemos fue debido a un artefacto metodológico. La falta de correlación exacta entre niveles de aldosterona plasmática y actividad de renina en situaciones de depleción y sobrecarga salina ha sido indicada recientemente por Bayard (267). Champlain (268) y Bayard (267) han indicado una supresión total de actividad de renina mediante sobrecarga sódica aunque los métodos que utilizan para la determinación de actividad de renina son de poca sensibilidad. En el estudio de Bayard, aunque su método no le permite detectar niveles de actividad de renina por debajo de 200 ng/100ml.,

encuentra una respuesta postural en los niveles de aldosterona en controles con sobrecarga salina. Por otra parte, Cohen (200) indica que los niveles de renina no están totalmente suprimidos por una ingesta elevada de sodio.

J. Best (205) ha publicado recientemente un estudio similar al realizado por nosotros, produciendo depleción salina mediante dieta pobre en sodio y viendo el efecto producido sobre angiotensina II y aldosterona plasmática determinada por un método de dilución doble isotópica. En este estudio encuentra una elevación a los niveles plasmáticos de aldosterona de un 308% del valor control después de 5 días en una dieta de 10 mEq Na y no encuentra ningún cambio significativo en los niveles de angiotensina II. Similarmente a estos resultados, nosotros hemos encontrado una disparidad entre los niveles de actividad plasmática de renina y aldosterona aunque nosotros si hemos encontrado un aumento en niveles de renina ante el estímulo de depleción sódica lo cual correspondería a un aumento similar en los niveles de angiotensina II.

Aumentos en niveles de angiotensina II han sido demostrados anteriormente como respuesta a la depleción salina aunque en estos trabajos se han utilizado diuréticos además de restricción sódica (269-270-271). Nuestros resultados junto con los de Best y Bayard indicarían una falta de relación primaria del sistema renina-angiotensina como el estímulo fisiológico en el estímulo de aldosterona a la restricción sódica aunque la disociación observada por nosotros no es tan marcada como la encontrada por Best midiendo directamente angiotensina II.

Los resultados de nuestro estudio postural así como los del estudio de sobrecarga y depleción salina constituyen en su conjunto una comprobación final de nuestro método de radioinmunoensayo al demostrar mediante dicho método cambios en los niveles de aldosterona ante distintos estímulos en concordancia con los obtenidos por otros métodos.

3 - Supresión con Fluorinef y DOCA en sujetos normales,
hiperaldosteronismo primario y secundario.

En el estudio realizado en sujetos normales, en todos ellos se demostraron niveles de aldosterona periférica menores que los valores control después de un día de supresión con 9- α Fluorocorticoides a Desoxicorticosterona, aunque el grupo tratado con DOCA mostró un grado de supresión significativamente mayor. Como puede verse en la figura (12), la media de los valores post-DOCA fueron de un 51.24% de la media control, mientras que la supresión media obtenida con Fluorinef fue de 72% del valor control. Hay que indicar que en el grupo tratado con Fluorinef los especímenes fueron obtenidos a las 8 A.M. después de 8 horas en posición decubito, este protocolo fue modificado en los sujetos tratados con DOCA, obteniendo los especímenes a las 10 A.M. después de dos horas en postura erecta en régimen ambulatorio (en pie y sentado) con objeto de poder utilizar el test en enfermos ambulatorios.

En la Tabla (38) se expresaron los resultados obtenidos en dos controles en los que se prosiguió la supresión con DOCA durante cuatro días con un total de 80 mgr. de DOCA, evidenciándose una progresiva supresión de los niveles de aldosterona aunque la supresión encontrada después de un día de supresión es satisfactoria. En estos dos controles se midieron niveles de actividad de renina plasmática encontrándose una progresiva supresión en relación con la supresión de aldosterona de acuerdo con la hipótesis de que la supresión en la secreción de aldoste-

rona producida por mineralocorticoides sería debido a una supresión de renina a causa de la expansión de volumen intravascular y por tanto a una generación disminuída de angiotensina.

En los enfermos con hiperaldosteronismo secundario estudiados, se comprobó también supresión de los niveles de aldosterona tanto con Fluorinef como con DOCA, siendo también superior el efecto supresor de DOCA que el de Fluorinef.

Con DOCA se obtuvieron unos valores post supresión de un 38% del valor control, mientras que con Fluorinef los valores fueron de un 61% del control. Comparando los grupos normales e hiperaldosteronismo secundario se comprueba que el grado de supresión en el último grupo es ligeramente superior al primario para cada mineralocorticoide, indicando una más facil supresibilidad en casos de hiperaldosteronismo secundario. En el grupo secundario se observa una correlación entre los niveles plasmáticos de aldosterona y los valores de secreción en 24 horas, observándose un descenso en estos después de la maniobra de supresión, con la excepción del paciente S.P., en que el valor presupresión de la secreción en 24 horas fue de 190 μ g y el post supresión de 200 μ g, viéndose en cambio un descenso en los niveles plasmáticos de 49.1 ng/100ml. a 15.3 ng/100ml. Este discordancia aparente quizás sea debida a que en el estudio de secreción control, el tritio recobrado en la orina de 24 horas fue sólo un 30%, considerándose un 60-70% el mínimo para considerar la medida precisa y por lo tanto el valor real de secreción control es factible que fuese bastante más ele-

vado que el obtenido de 190 $\mu\text{g}/24\text{h}$.

En los enfermos con hiperaldosteronismo primario estudiados, al contrario que en los otros dos grupos, no se apreció supresión significativa en los niveles plasmáticos de aldosterona, con excepción de la enferma F.G. que mostró una supresión normal con Fluorinef. Esta enferma mostró también supresión en el estudio de secreción en 24 horas a pesar de haberse observado una actividad de renina suprimida antes y después de la supresión. En vista de los resultados en el estudio de cateterización que indicaba aumento de aldosterona en la vena suprarrenal izquierda fue operada extirpándosele la glándula suprarrenal izquierda donde existía un adenoma solitario. En la actualidad la enferma es normotensa.

El hallazgo de valores normales de aldosterona plasmática en enfermos con hiperaldosteronismo primario, ha sido encontrado previamente a este estudio por Brown (185) en 6 enfermos con hiperaldosteronismo primario, comprobado quirúrgicamente. Brown, utilizando un método doble isotópico para la determinación de aldosterona plasmática, ha indicado como puede variar considerablemente en estos enfermos como también ha subrayado las fluctuaciones espontáneas en la producción de aldosterona por estos tumores.

Esta peculiaridad es la que hace aún más eficaz la maniobra de supresión en el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario, pues por otra parte aún en el caso de hiperaldosteronemia, su simple determinación no permite separar las formas primarias y secundarias.

Los resultados obtenidos en el grupo de hiperaldosteronismo primario sugieren que la falta de supresión es más

evidente en los niveles plasmáticos que en la medida de secreción en 24 horas, evidenciando quizás las dificultades técnicas en estos estudios que ya hemos indicado antes.

La correlación entre los niveles de renina y aldosterona en los especímenes pre y post supresión existe también en el grupo secundario, siendo los niveles de renina en el segundo espécimen menores que en el primero, aunque en algunos casos no se observa una disminución correlativa con el descenso en los niveles de aldosterona.

En el grupo secundario, igual que en el grupo de controles, DOCA produjo una supresión más eficaz que Fluorinef en los niveles de aldosterona. En la figura (14) se expresa graficamente la supresión obtenida en cada uno de los grupos de hiperaldosteronismo secundario y primero. En la figura (13) se compara el efecto de DOCA o Fluorinef en los niveles plasmáticos de aldosterona en enfermos con hiperaldosteronismo primario o secundario.

Nuestros resultados de supresión en los niveles plasmáticos de aldosterona son similares a los obtenidos por Biglieri midiendo excreción urinaria de aldosterona o secreción en 24 horas. Utilizando DOCA (186) o Fluorinef (272), encuentra supresión de la producción de aldosterona en sujetos normales e hiperaldosteronismos secundarios sin observar supresión en los casos primarios.

Biglieri encuentra un mejor efecto supresor con DOCA que con Fluorinef, lo cual coincide con nuestros resultados.

Es evidente la ventaja de nuestra modificación del test de Biglieri ya que en éste, ya se trate de DOCA o Fluorinef, el estudio necesita un mínimo de cuatro días, uno para el estudio control en orina de 24 horas y otros tres para la administración del mineralocorticoide (DOCA 20 mgr. día x 3 o Fluorinef 0.4 mgr. día x 3), además de la necesaria hospitalización para el estudio secretorio, mientras que nuestros resultados indican que un solo día de administración de mineralocorticoide es suficiente para producir un descenso marcado en los niveles periféricos de aldosterona en sujetos normales y en hiperaldosteronismos secundario, distinguiendo estos de los casos primarios. Siendo la administración de DOCA en sujetos ambulatorios la maniobra más eficaz, esta maniobra puede ser utilizada de una manera eficaz en enfermos hipertensivos en régimen ambulatorio. En cualquier enfermo en que se sospeche hiperaldosteronismo primario se puede realizar la maniobra descrita con la simple obtención de dos especímenes de sangre periférica sin necesidad de hospitalización.

La no supresión de los niveles de aldosterona periférica con 20 mgr. de DOCA indicaría un alto índice de sospecha del diagnóstico de hiperaldosteronismo primario, seleccionando así los casos que necesiten procedimientos diagnósticos más complicados, como cateterización de vena suprarrenal.

La maniobra descrita no distingue los casos de hiperaldosteronismo primario producidos por adenoma o hiperplasia nodular, al igual que en el test original de Biglieri (272).

Hasta ahora el único medio diagnóstico capaz de distinguir las dos entidades ha sido el estudio de los niveles

de aldosterona en plasma de vena suprarrenal evidenciando discrepancia entre ambos lados.

Recientemente Ferriss (273) ha publicado un análisis retrospectivo en 34 casos de hiperaldosteronismo primario en los cuales, mediante un análisis multidimensional de ocho variables (concentraciones plasmáticas de aldosterona, renina, sodio, potasio y CO_2 , presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y edad), consigue separar los casos de adenoma e hiperplasia.

Ferriss (273) y Brown (185), utilizando un método doble isotópico, encuentran una media de niveles plasmáticos de aldosterona más elevada en casos de adenoma que de hiperplasia, aunque utilizando la media de repetidas observaciones ya que indican la gran variabilidad de dichos niveles en estos enfermos en distintas observaciones ante condiciones similares con observaciones intermitentes de normo aldosteronemia como ya hemos comentado y esto sería la causa de que en la observación control única en los enfermos estudiados por nosotros, no encontremos esta diferencia.

La única maniobra diagnóstica hasta ahora descrita comparable a la nuestra sería la descrita recientemente por Kem (274), que utiliza la supresión de niveles plasmáticos de aldosterona mediante la administración de 2 litros de suero salino isotónico, obteniendo resultados similares a los nuestros al suprimir los niveles plasmáticos de aldosterona en casos de hiperaldosteronismo secundario no suprimiéndose en casos primarios.

Es nuestra opinión que la administración del suero salino en un período de cuatro horas hace esta maniobra de

utilización más difícil que la nuestra en régimen ambulatorio.

Es interesante destacar el hallazgo anatomopatológico en la enferma I.Z. en que se encontró hiperplasia bilateral más un adenoma bien definido en la suprarrenal izquierda similar a los casos descritos por George (17). En este enfermo se planteó la posibilidad de un caso que podría incluirse en el hipotético grupo denominado hiperaldosteronismo terciario, en que un estímulo continuo produciría hiperplasia de la glomerulosa y con la persistencia del estímulo un adenoma autónomo. En esta enferma la historia no indicaba nada que hiciese pensar en dicho mecanismo fisiopatológico ya que sus únicos antecedentes fueron el comienzo de hipertensión cinco años antes de la intervención quirúrgica, con la aparición de hipokaliemia espontánea diez meses antes de los estudios diagnósticos. Actualmente la enferma es normotensa y es tratada únicamente con terapia supletoria suprarrenal.

Los resultados del estudio de niveles de aldosterona en plasma de vena suprarrenal concuerdan con el valor diagnóstico y de localización indicado por Melby (141) ya que los casos de adenoma presentaron niveles de aldosterona significativamente mayores en el lado correspondiente. La estimulación con angiotensina confirma los estudios previos de Spark (169), demostrando una gran sensibilidad de los adenomas productores de aldosterona a pequeños aumentos en los niveles de angiotensina. En nuestros resultados los adenomas parecen ser igualmente sensibles al estímulo de ACTH en contraposición a sus resultados, que indicaban una selectividad

exclusiva al estímulo de angiotensina del tejido adematoso.

La ventaja de determinar los niveles de aldosterona en plasma de vena suprarrenal por medio de nuestro método de radioinmunoensayo es evidente ya que, con el método utilizado por Spark et al., el nivel mínimo detectable es de 0.5 $\mu\text{g}\%$, mientras que con nuestro radioinmunoensayo pueden detectarse niveles de hasta 1 $\text{ng}\%$ o sea niveles 500 veces inferiores.

De los siete enfermos estudiados con hiperaldosteronismo primario en cinco, el responsable del síndrome era un adenoma, estando en los cinco casos situado en la glándula suprarrenal izquierda, lo cual concuerda con las observaciones de Conn quien encuentra una preponderancia en la localización izquierda de los adenomas productores de aldosterona (165-275).

4 - Regulación de niveles de Aldosterona en sujetos anéfricos.

En este estudio la depleción sódica producida por depleción isonatrémica de volumen no produjo ningún aumento significativo en los niveles plasmáticos de aldosterona en sujetos anéfricos, indicando estos resultados que el riñón es esencial para la respuesta normal de la secreción de aldosterona a la depleción sódica en el hombre anéfrico. Estos resultados están en acuerdo con los resultados de Boyd (270) que, utilizando un método doble isotópico, encontró niveles plasmáticos de aldosterona por debajo de 2 ng% en tres enfermos anéfricos después de deplecionados de 170-330 mEq Na mediante diálisis peritoneal. El único estudio comparable al realizado por nosotros ha sido el de Bailey, Blair-West et al., sometido recientemente a publicación (250). En dicho estudio la depleción isonatrémica de volumen en sujetos anéfricos se logró durante hemodialis igual que la realizada por nosotros, aunque efectuando una depleción mayor equivalente a unos 2 kg. de peso corporal.

Los niveles de aldosterona fueron determinados por un método doble isotópico, encontrando iguales resultados que nosotros al no producirse ninguna elevación de niveles de aldosterona ante el estímulo utilizado.

En el enfermo K.W. un descenso en los niveles plasmáticos de potasio de 7.4 a 5.0 mEq/L. mediante hemodialis se acompañó de un descenso en los niveles de aldosterona de 5.0 a 1.9 ng%. Esta variación parece estar de acuerdo con los resultados obtenidos por Bayard (267), quien encuentra una relación directa entre niveles plasmáticos de potasio y aldosterona en sujetos anéfricos, sugiriendo que el estímulo regulador primario de la secreción de aldosterona en

ausencia del riñon sería la concentración plasmática de potasio. Un efecto similar de los niveles de potasio ha sido observado en cordero hipofisectomizado y nefrectomizado por Blair-West (249).

Los niveles de aldosterona encontrados por nosotros en sujetos anéfricos se encuentran por debajo de los niveles normales descritos en el estudio en sujetos normales y de los valores normales descritos por otros autores y citados en la discusión de resultados del método. Este hallazgo está de acuerdo con los estudios realizados por otros autores en sujetos nefrectomizados (250-267-270).

Gleadle a descrito niveles elevados de aldosterona en tres sujetos hipertensos que disminuyeron acusadamente después de nefrectomía bilateral (276). Como ya hemos indicado en la introducción, en el perro y cordero deplecionados de sodio e hipofisectomizados, la nefrectomía bilateral reduce la secreción de aldosterona a niveles basales (247-248-249-277), indicando el papel esencial del riñon en el control de la secreción de aldosterona, mientras que en la rata la nefrectomía no causa un descenso en la secreción de aldosterona y la depleción sódica en el animal nefrectomizado produce una elevación normal de aldosterona (223).

En nuestro estudio postural, con la única excepción del enfermo E.M., no hemos observado cambio en los valores basales de aldosterona mediante el estímulo postural. En la figura (16) se evidencia la disparidad entre la respuesta observada en once sujetos normales y los seis sujetos anéfricos utilizando el mismo estímulo postural.

Esta falta de estimulación coincide con las observaciones de los dos únicos estudios similares realizados por Bayard (267) y Bailey - Blair-West (250).

Balikian (212) ha encontrado la misma falta de estimulación en un sujeto anéfrico mediante el estudio de concentración de aldosterona en plasma de vena adrenal y utilizando una tabla de balanceo.

Estos resultados sugieren que la respuesta de la secreción de aldosterona ante el estímulo postural sería mediada por el sistema renina angiotensina.

Los niveles de renina plasmática desaparecen rápidamente después de nefrectomía bilateral, siguiendo una curva de dos componentes, indicando la posibilidad de producción extrarenal de renina (278-279).

La presencia de actividad de renina de origen extra adrenal observada en dos pacientes en nuestro estudio ha sido observada anteriormente (250-280-281-282), siendo su origen probable el utero en mujeres, siendo desconocido su origen en el hombre.

Un posible factor que influyese en los bajos niveles de aldosterona encontrados en sujetos anéfricos podría ser la administración intermitente de heparina en los períodos de hemodialisis.

Heparina es un inhibidor de la producción de aldosterona, lo cual es conocido desde las observaciones de hipoaldosteronismo en pacientes sometidos a tratamiento crónico con heparina (283) y la supresión de la respuesta a la secreción de aldosterona en sujetos sometidos a depleción sódica (284).

La reducción en la producción de aldosterona por heparina sería causada por un bloqueo en su bio-síntesis según ha indicado Casparie (285) y Conn (286). Por otra parte, Sealey (287) ha indicado que heparina produce una inhibición en la reacción renina-renina sustrato, aunque Bailey (284) ha indicado que el efecto de heparina sería fundamentalmente en el proceso de síntesis sin encontrar cambios en la concentración de renina o su sustrato con la administración de heparina.

En nuestro estudio los enfermos recibieron una media de 100 mgr. de heparina en cada sesión de hemodialisis o sea unos 300 mgr. por semana, dosis mucho menor que la indicada por Bailey (284), de más de 300 mgr./día como inhibidora de la síntesis de aldosterona y además administrada en forma continua durante largo tiempo. Por otra parte, los estudios de aldosterona en vena suprarrenal realizados por nosotros en sujetos anéfricos indican una marcada respuesta de la producción de aldosterona a la infusión de ACTH en tres enfermos y una respuesta también positiva a la infusión de angiotensina en un enfermo. Como estos enfermos anéfricos estaban sometidos al mismo tratamiento de heparina que el primer grupo, estos resultados indican que en las condiciones del estudio, aún en el caso de que hubiese algún bloqueo en la producción de aldosterona, este bloqueo no sería suficiente como para suprimir la respuesta a un estímulo. Por último, recientemente Bayard (267) ha estudiado el efecto de heparina en dosis similares a las utilizadas en nuestro estudio de 100 mgr. en un período de siete horas, observando que los niveles plasmáticos de aldosterona eran más elevados al final de la infusión que al principio.

Estos resultados, junto a los ya comentados de nuestro estudio de cateterización, indican que los bajos niveles de aldosterona encontrados y su falta de respuesta al estímulo postural y al de depleción isonatrémica de volumen, no son causados por la heparina administrada.

El estudio comentado sugiere pues que el riñón parece ser esencial en el control de la respuesta secretoria de aldosterona a la depleción sódica en el hombre, aunque sin dilucidar si el papel jugado por el sistema renina angiotensina es directo o permisivo en dicha respuesta.

También el estudio sugiere que el riñón es esencial en la respuesta secretoria de aldosterona al cambio postural y que en el hombre anéfrico existe una disminución de la secreción de aldosterona con respuesta disminuída a los estímulos fisiológicos.

C O N C L U S I O N E S

Ha sido objeto del presente trabajo, el desarrollo de un método analítico de determinación de concentraciones de Aldosterona en plasma periférico. El método desarrollado, es un sistema de radioinmunoensayo, en el que hemos utilizado como ligando anticuerpos específicos obtenidos por la inyección en cordero de D-aldosterona-18,21-dihemisuccinato. En el curso del desarrollo del método, hemos estudiado la especificidad de los distintos antisueros obtenidos y los distintos sistemas de extracción, partición y cromatografía, hasta encontrar los más idóneos que son descritos en el protocolo definitivo, al igual que las condiciones de equilibrio y separación del método de radioinmunoensayo.

Hemos analizado la precisión y exactitud del método, mediante comprobación "in vitro", demostrando que dicha precisión y exactitud es satisfactoria. Hemos comparado los valores obtenidos con nuestro método de radioinmunoensayo, con los previamente obtenidos con técnicas de doble dilución isotópica, comprobando su concordancia.

Semejante concordancia ha sido encontrada al determinar niveles de aldosterona en plasma de vena suprarrenal, con nuestro método de radioinmunoensayo y con el método de Tait.

La técnica de radioinmunoensayo para determinación de niveles de Aldosterona en plasma periférico, gracias a su sencillez y exactitud, permite la generalización de dicha determinación hasta ahora restringida a los pocos departamentos de investigación, con los medios suficientes para el uso de

técnicas doble isotópicas. Por otra parte, la extremada complicación y dificultad de estas técnicas, no han permitido las numerosas determinaciones necesarias en el estudio sistemático de niveles de Aldosterona, tanto en sujetos normales como en distintas situaciones clínicas.

Por ser la primera vez que se determinan niveles plasmáticos de Aldosterona, por medio de radioinmunoensayo, solo hemos podido comparar nuestro método con los otros dos únicos sistemas de radioinmunoensayo que han sido desarrollados simultáneamente al nuestro en otros dos laboratorios, siendo nuestra opinión que la utilización de una única cromatografía en capa fina en el proceso de purificación, hace nuestro método el más sencillo de los tres hasta ahora existentes.

En la segunda parte del trabajo, hemos descrito los trabajos clínicos realizados como aplicación del método y última comprobación de su utilidad clínica.

En primer lugar, hemos determinado los valores normales en condiciones basales y ante distintos estímulos, como cambio postural y depleción salina, e inhibiciones como sobrecarga salina o supresión con mineralocorticoides.

Los resultados obtenidos en estos estudios control están en concordancia con los estudios hasta ahora realizados con técnicas de estudio de tasa de secreción o con métodos doble isotópicos.

Como aplicación clínica inmediata del método, hemos ideado un test rápido de 24 horas para el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario, utilizando la determinación de niveles plasmáticos de Aldosterona, antes y después de la admi-

nistración de 20 mgr. de DOCA en 24 horas, comprobando que dicha maniobra produce supresión de los niveles plasmáticos de Aldosterona en sujetos normales y en casos de hiperaldosteronismo secundario, sin producir supresión en pacientes con hiperaldosteronismo primario.

Creemos que esta maniobra supone un gran avance en los estudios diagnósticos de hiperaldosteronismo primario, pues al haber adaptado las condiciones del estudio a las existentes en regimen ambulatorio, es posible realizar estudios de despistaje en elevado número de enfermos ambulatorios, con la simple medición de niveles de Aldosterona en plasma periférico, que gracias a nuestro método de radioinmunoensayo puede hacerse de manera rápida y práctica.

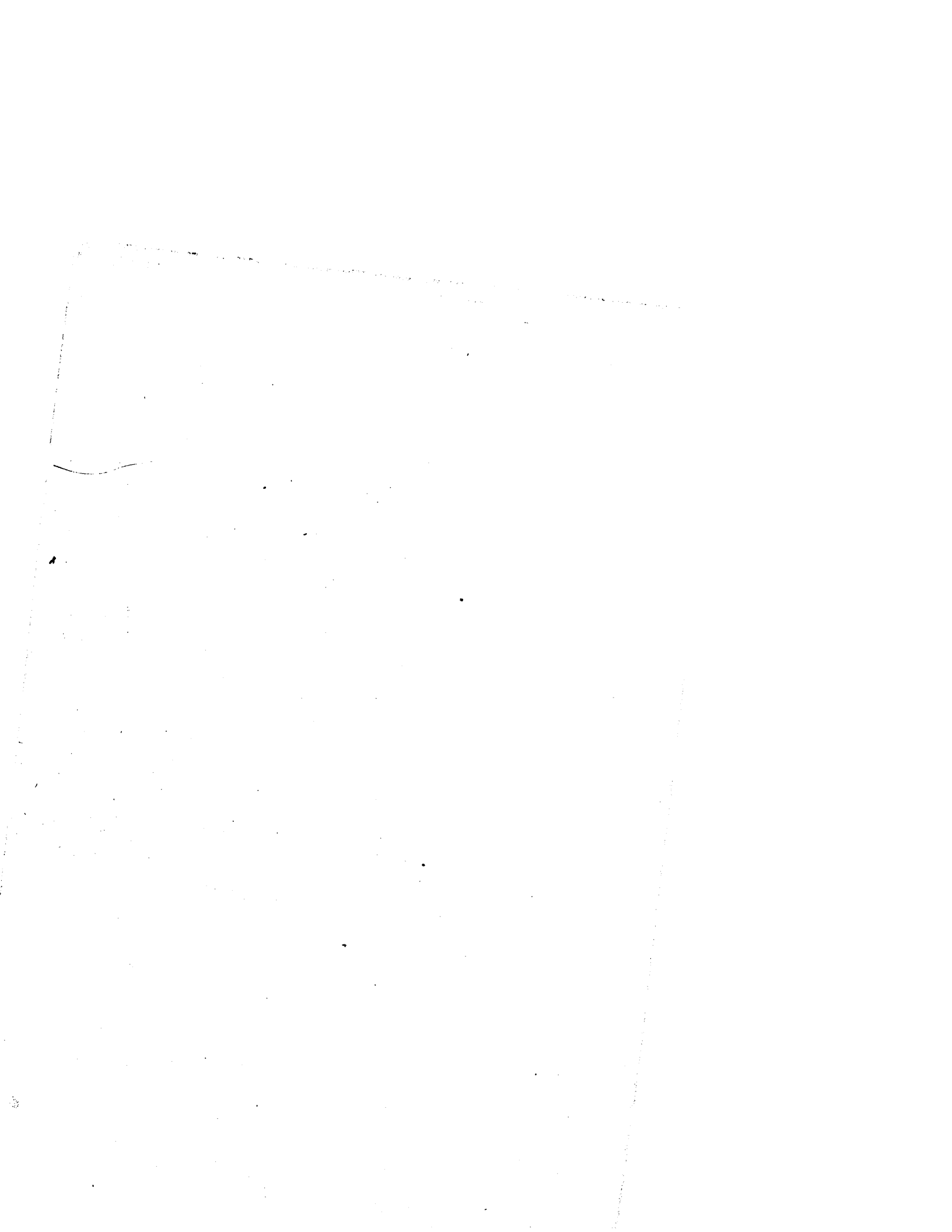
De esta manera, se simplifica grandemente el estudio diagnóstico de estos enfermos, ya que las maniobras de supresión con mineralocorticoides hasta ahora utilizadas, necesitaban el estudio en regimen interno, durando el estudio un mínimo de cinco días, evitándose además la necesidad de la administración de hormona radioactiva para las determinaciones de tasa de secreción.

En nuestro estudio de maniobras de supresión, hemos comparado los mineralocorticoides DOCA y 9- α -Fluorocortisol, comprobando la mayor efectividad de DOCA en la supresión de niveles plasmáticos de Aldosterona.

Otro estudio clínico realizado utilizando el método de radioinmunoensayo, ha sido el de la regulación de niveles de Aldosterona plasmática en sujetos anéfricos, comprobando que en el hombre, el sistema Renina-Angiotensina parece ser esencial para la respuesta de secreción de

Aldosterona ante el estímulo de depleción salina, comprobando por primera vez que el mecanismo regulador de secreción de Aldosterona es, en estas condiciones, similar en el hombre al de cordero y perro, en contraposición a la rata, en que ante el estímulo de depleción salina, aún en ausencia del sistema renina Angiotensina, existe una respuesta de aumento de secreción de Aldosterona. Los niveles de Aldosterona periférica encontrados en estos sujetos anéfricos, son inferiores a los de sujetos normales, existiendo en sujetos anéfricos una falta de respuesta de secreción de Aldosterona ante el estímulo postural. Estas observaciones indican un déficit en la respuesta fisiológica del sistema regulador de la secreción de Aldosterona, bajo las condiciones clínicas descritas.

BIBLIOGRAFIA



- 1 - Thorn G.W., S.A. Dorrance, E. Day.
Ann. Int. Med. 16 : 1053, 1.942
- 2 - Ferrebee J.W., D. Parker, W.H. Carnes, M.K. Gerit,
D.W. Atchey, R.F. Loeb.
Amer.J. Physiol. 135:230, 1941
- 3 - Relman A.S., W.B. Schwartz.
Yale J. Biol. Med. 24:540, 1952
- 4 - Luetscher J.A.
Recent Progr. Hormone Res. 12:175, 1956
- 5 - Laragh J.H., H.C. Stoerk
J. Clin. Invest. 34:913, 1955
- 6 - Johnson B.B., A.H. Lieberman, P.J. Mulrow.
J. Clin. Invest. 36:757, 1957
- 7 - Simpson S.A., J.F. Tait, A. Wettstein, R. Neher,
J. von Euw, O. Schindler, T. Reichstein.
Experientia 10:132, 1954
- 8 - Luetscher J.A., A. Dowdy, J. Harvey, R. Neher,
A. Wettstein.
J. Biol. Chem. 217:505, 1955
- 9 - Conn J.W.
J. Lab. Clin. Med. 45:3, 1955
- 10 - G.W. Thorn
En "Aldosterone". D.P. Lauler ed.
Medcom G.D. Searle Co. New York 1969 p. 3

- 11 - Conn J.W., E.L. Cohen, D.R. Rowner.
J.A.M.A. 190:213, 1964
- 12 - Conn J.W.
J.A.M.A. 190:222, 1964
- 13 - Zimmerman H.D., J. Kracht
Frankfurt 2. Path. 76:32, 1966
- 14 - Van Berchem F.S., M. Doorenbos, H.S. Helms.
Lancet 2:335, 1956
- 15 - Bartter F.C., E. Biglieri.
Ann. Int. Med. 48:647, 1958.
- 16 - Davis W.W., H.H. Newsome, L.D. Wright, W.G. Hammorel,
J. Easton, F.C. Bartter.
Amer. J. Med. 42:642, 1967
- 17 - George J., L. Wright, N. Bell, F.C. Bartter.
Amer. J. Med. 48:343, 1970
- 18 - Katz F.H.
Ann. Int. Med. 67:1035, 1967
- 19 - Granger P., R. Boucher, J. Genest.
Un. Med. Canada 97:1226, 1968
- 20 - Neville A.M., T. Symington.
Cancer 19:1854, 1966
- 21 - Sasano N.
Jap. J. Urol. 56:937, 1965
- 22 - Reidbord H., E.R. Fisher.
Arch. Path. 88:155, 1969

- 23 - Genest J., E. Koiw, W. Nowaczynsky, G. Leboenf.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 97:676, 1958
- 24 - Laragh J.H., S. Ulick, V. Jaunszewicz, Q.B. Denning,
W.G. Kelly, S. Lieberman.
J. Clin. Invest. 39:1091, 1960
- 25 - Laragh J.H., J.G. Ledingham, S.C. Sommers.
Trans. Ass. Amer. Physicians. 80 1967
- 26 - Conn J.W., E.S. Conn.
Recent Progr. Hormone Res. 17:389, 1961
- 27 - Holten C., W.P. Petersen.
Lancet 2:918, 1956
- 28 - Mcran N., F. Goetz, J.C. Melby, B. Zimmerman, B.Kennedy.
Amer. J. Med. 28:638, 1960
- 29 - Alterman S.L., C. Dominguez, A. López Gómez, A.L.Lieber.
Cancer 24:602, 1969
- 30 - Foye L.V., T.V. Feitchmeir.
Amer. J. Med. 19:1966, 1955
- 31 - Conn J.W., E. Cohen, D. Rovner, R. Nesbit.
J.A.M.A. 193:200, 1965
- 32 - Melby J.C.
Practitioner 200:519, 1968
- 33 - Biglieri E.G.
J. Clin. Endocr. 27:715, 1967
- 34 - Sutherland D.J., J.L. Ruse, J.C. Laidlaw.
Canad. Med. Ass. J. 95:1109, 1966

- 35 - New M.I., R.E. Peterson.
J. Clin. Endocr. 27:300, 1967
- 36 - Miura K., K. Yoshinaga, K.Goto, I. Katsushima,
M. Maebashi, H. Demura, M. Iino, T. Torikai.
J. Clin. Endocr. 28:1807, 1968
- 37 - Bartter F.C., R.I. Henkin, G.T. Bryan.
J. Clin. Invest. 47:1742, 1968
- 38 - Davis J.O.
Symposium in Aldosterone, Discussion
1st International Congress of Endocrinology
Copenhagen 1960.
- 39 - Davis J.O.
Progr. Cardio. Dis. 4:27, 1961
- 40 - Tobian L.
Physiol. Rev. 40:280, 1960
- 41 - Skinner S.L., J. Mc Cubbing, I.H. Page.
Circ. Res. 15:64, 1964
- 42 - Brown J.J., D.L. Davies, A.F. Lever, J.I. Robertson
Canad. Med. Ass. J. 90:201, 1964
- 43 - Veirat R., J. de Champlain, R. Boucher, J. Genest.
Canad. Med. Ass. J. 90:201, 1964
- 44 - Winer B.
Proc. New Eng. Cardio. Soc. 21:43, 1963
- 45 - Blair-West J., J.P. Cohglan, D.A. Denton, J.R. Goding,
J.A. Munroe, R.E. Peterson, M. Wintour.
J. Clin. Invest. 41:1606, 1962

- 46 - Thurán K.
Amer. J. Med. 36:698, 1964
- 47 - Davis J.O.
"The Adrenal Cortex" Ed. A.B. Eisenstein,
pp. 203-247. Little, Brown and Co.
Boston, 1967
- 48 - Davis J.O.
J.A.M.A. 188:1062, 1964
- 49 - Davis J.O., P.M. Hartford, E.O. Titus, C.J. Carpenter,
C.E. Evers, H. Spiegel.
J. Clin. Invest. 41:378, 1962
- 50 - Luetscher J.A., A. Dowdy, A. Callahan, A.P. Cohn.
Trans. Ass. Amer. Physicians 75:293, 1962
- 51 - Wolff H.P., D. Lommer, J. Janecke, M. Torbica.
"Aldosterone" p. 471, Blackwell Scientific
Publ. Oxford, 1964
- 52 - Tait J.F., J. Bougas, B. Little, S.A. Tait, C. Flood.
J. Clin. Endocr. 25:219, 1965
- 53 - Bougas J., C. Flood, B. Little, J.F. Tait, S.A. Tait,
R. Underwood.
"Aldosterone", p. 25, Blackwell Scientific
Publ., 1964
- 54 - Camargo C.A., A.J. Dowdy, E.W. Hancock, J.A. Luetscher.
J. Clin. Invest. 44:356, 1965
- 55 - Carpenter C.C., J. Davis, C. Ayers.
J. Clin. Invest. 40:2026, 1961

- 56 - Davis J., T. Brown.
Abstracts, 47th Meeting of the Endocrine
Society, New York, 1965
- 57 - Johnson C.I., A.D. Jose.
J. Clin. Invest. 42:1411, 1963
- 58 - Laragh J.H.
Circulation 25:1015, 1962
- 59 - Thorn G.
J.A.M.A. 206:333, 1968
- 60 - Veyrat R., M. Robert, R.S. Mach.
Schweitz. Med. Wschr. 98:1499, 1968
- 61 - Kuchel O., K. Horky, I. Gregorva, J. Mareck,
J. Kopecka, J. Kobilkova.
Ann. Int. Med. 73:245, 1970
- 62 - Clarckson B., D. Thompson, M. Horwith, E.H. Luckey.
Amer. J. Med. 29:193, 1960
- 63 - Coleman M., M. Horwith, J. Brown.
Amer. J. Med. 49:106, 1970
- 64 - Laragh J., S. Ulick, V. Jannszewicz, Q. Denning,
W. Kelly.
J. Clin. Invest. 39:1091, 1960
- 65 - Genest J., R. Boucher, J. de Champlain, R. Veyrat,
M. Chretien, P. Biron, G. Tremblay, P. Roy,
P. Cartier.
Canad. Med. Ass. J. 90:263, 1964.

- 66 - Katt K.J., P.Z. Zimmet, M.D. Cain, E. Cran, J.B. Best,
J.P. Coghlan.
Lancet 1: 459, 1971
- 67 - Golblatt H.
Amer. J. Surg. 107:1, 1964
- 68 - Sambhi M.P., B. Levitan, J. Beck, E. Venning.
Metabolism 12:498, 1963.
- 69 - Peart W.S., J. Robertson, D. Grahame-Smith.
Circulation Res. 9:1171, 1961
- 70 - Mulrow P.J., B. Lytton, H. Stansel.
"L'Hypertension Arterielle" Ed. P. Milliez
y P. Tcherdakoff. Paris 1966.
- 71 - Boyd G.W., J. Landon, W. Peart.
Proc. R. Soc. B. 173:327, 1969
- 72 - Swartz J., R. Bloch.
Presse Med. 77:237, 1969
- 73 - Weidmann P., W. Siegenthaller, N. Ziegler, H. Sulser,
P. Endres, C. Werning.
Amer. J. Med. 47:528, 1969
- 74 - Laragh J.H., J. Sealey, J. Ledinham, M. Newton.
J.A.M.A. 201:918, 1967
- 75 - Woods J.W.
Lancet 2:653, 1967
- 76 - Briggs E., A. Mack, L. Taylor, J. Browning, L. Naismith,
E. Wilson.
Lancet 1:467, 1971

- 77 - Harris P.W.
Lancet 2:466, 1969
- 78 - Weinberg M.H., D. Collins, A.J. Dowdy, G. Noker,
J. Luetscher.
Ann. Int. Med. 71:891, 1969
- 79 - Lipsett M., J.W. Combs, D.G. Seigel.
Ann. Int. Med. 74:251, 1971
- 80 - Helmer O., W. Judson.
Amer. J. Obstet. Gynec. 99:9, 1967
- 81 - Robertson P.W., A. Klidjian, L.K. Harding, G. Walters,
M. Lee, A.H. Robb-Smith.
Amer. J. Med. 43:963, 1967
- 82 - Hoshino T., H. Seida.
Acta Path. Jap. 18:197, 1968
- 83 - Hanger Klevene J.H.
Cancer 26:1112, 1970
- 84 - Bartter F.C., P. Pronove, J. Gill.
Amer. J. Med. 33:811, 1962
- 85 - Trygstad C.W., J.A. Mangos, J. Bloodworth, C. Lobeck.
Pediatrics 44:234, 1969
- 86 - Bocksor K, F. Seif.
Klin. Wschr. 46:1201, 1968
- 87 - Goodman A.D., A. Vagnuzzi, P. Hartroft.
New Eng. J. Med. 281:1435, 1969

- 88 - Sutherland L.E., P. Hartroft, J. Babs.
Acta Paediat. Scand. Suppl. 201, 1970
- 89 - Streeten D.H.
Periodic Paralysis en "The Metabolic Bases
of Inherited Diseases" Ed. J.B. Stanbury.
Mc Graw Hill, N.Y. 1966, p. 921
- 90 - Gross F.
Geburtsch. U. Frauenheilk. 26:141, 1966
- 91 - Chesley L.C., I.H. Tepper.
J. Clin. Endocr. 27:576, 1967
- 92 - Holmes A.M., C.M. Hesling, T.M. Wilson.
Quart. J. Med. 39:299, 1970
- 93 - Campbell A.H., O.E. Neufeld.
Med. J. Aust. 1:725, 1951
- 94 - Roussak N.J.
Brit. Med. J. 1:360, 1952
- 95 - Forsham P.H.
"Textbook of Endocrinology" Ed. R.H. Williams
W.B. Saunders Co. Phil. 1968, p. 344.
- 96 - Melby J.C., S. Dale, T. Wilson.
Circ. Res. Suppl. vols. 28-29, II:143, 1971
- 97 - Melby J.C., T. Wilson, S. Dale.
J. Clin. Invest. 49:64, 1970
- 98 - Biglieri E.G., S. Hane, P.E. Slaton, P.H. Forsham.
J. Clin. Invest. 42:516, 1963

- 99 - Hudson J.B., A. Chobanian, A. Relman.
New. Eng. J. Med. 257:529, 1957
- 100 - Jacobs D.R., J.B. Posner.
Metabolism. 13:522, 1964.
- 101 - Ulick S.
J. Clin. Endocr. 24:669, 1964
- 102 - Visser H.K., W. Cost.
Acta Endocrinol. Suppl. 89:31, 1964
- 103 - Mc Allister R., A. Michelakis, H. Sanstead.
Arch. Int. Med. 127:919, 1971
- 104 - Sanstead H.H., A. Michelakis, T. Temple.
Arch. Environ. Health. 20:356, 1970
- 105 - Vagnucci A.H.
J. Clin. Endocr. 29:279, 1969
- 106 - Royer P.
Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 12:111, 1967
- 107 - Cristlieb A., R. Hickler, D. Laufer, G. Williams.
New Eng. J. Med. 281:128, 1969
- 108 - Williams G., L. Rose, R. Dluhy, D. Mc Caughn,
P. Jagger, R. Hickler, D. Laufer.
Ann. Int. Med. 72:317, 1970
- 109 - France R., J. Merrill, W. Tolleson.
Trnas.Amer. Clin. Climat. Ass. 71:45, 1969

- 110 - Bongiovanni A.M., A.W. Root.
New Eng. J. Med. 268:1283, 1963
- 111 - Cara J., L.I. Gardner.
J. Pediatrics 57:461, 1960
- 112 - Biglieri E.G., M. Herron, N. Brust.
J. Clin. Invest. 45:1946, 1966
- 113 - Goldsmith O., D. Solomon, R. Horton.
New Eng. J. Med. 277:673, 1967
- 114 - Liddle G.W., T. Bledsoe, W. Coppage.
Trans. Ass. Amer. Physicians 76:199, 1963
- 115 - Marquezy R.A., H. Bricaire, M. Landat, G. Courfaret,
M. Philibert.
Ann. Endocr. 26:247, 1965
- 116 - Mozzocani P., C. Dubost, J. Hironde, F. Girard,
C. Altal, E. Baulier.
Sem. Hop. 34:3173, 1958
- 117 - Mader I.J., L. Iseri.
Amer. J. Med. 19:976, 1955
- 118 - Fraser K.J., J. Landon.
Lancet 2:1116, 1968
- 119 - Revers F.E.
Nederl. T. Geneesk. 90:135, 1946
- 120 - Molhuysen J.A.
Lancet 2:381, 1950
- 121 - Conn J.W., D. Rovner, E. Cohen.
J.A.M.A. 205:492, 1968

- 122 - José A., J.R. Crout, N.M. Kaplan.
Ann. Int. Med. 72:9, 1970
- 123 Jose A., N.M. Kaplan.
Arch. Int. Med. 123:141, 1969
- 124 - Kaneko Y., T. Ikedo, I. Takeda.
Circulation 38:353, 1968
- 125 - Kirkendall W.M., A. Fitz, M. Amstrong.
Dis. Chest 45:337, 1964
- 126 - Woods J.W., G.W. Liddle, E.G. Staut.
Arch. Int. Med. 123:336, 1969
- 127 - Adlin E.W., B. Chammick, A. Marks.
Circulation 39:685, 1969
- 128 - Gunnells J.C., W. Mc Guffin, R. Robinson, E. Grim,
S. Wells, D. Silver, J. Glenn.
Ann. Int. Med. 73:901, 1970
- 129 - Russell R.P., A.T. Masi.
Ann. Int. Med. 73:195, 1970
- 130 - Fishman L.M., O. Kuchel, G.W. Liddle.
J.A.M.A. 205:497, 1968
- 131 - Kaplan N.M.
Arch. Int. Med. 123:152, 1969
- 132 - Conn J.W.
The Harvey Lecture Series 62:257, 1968

- 133 - Lauer D.P., G.H. Williams, G.W. Thorn.
"Principles of Internal Medicine"
Mc Graw Hill Co. New York 1970, p. 447.
- 134 - Bledsoe T., G.W. Liddle, A. Riondel, D.P. Island,
D. Bloomfield, B. Sinclair-Smith.
J. Clin. Invest. 45:264, 1966
- 135 - Hernando-Avendano L., J. Crabbe, E.J. Ross,
W.J. Reddy, A.E. Renold, D.H. Nelson, G.W. Thorn.
Metabolism 6:518, 1957
- 136 - Mattox V., M.L. Lewbart.
J. Clin. Endocr. 19:1159, 1959
- 137 - Staul M., J. Dingman.
J. Clin. Endocr. 21:148, 1961
- 138 - Tait S.A.S., J.F. Tait, M. Okamoto, C. Flod.
Endocrinology 81:1213, 1967
- 139 - Horton R.
Amer. J. Clin. Path. 54:297-311, 1970
- 140 - Kliman B., R. Peterson.
J. Biol. Chem. 235, 1639, 1960
- 141 - Melby J.C., R.F. Spark, S.L. Dale, R.H. Egdahl,
P.C. Kahn
New Engl. J. Med. 277:1050, 1967
- 142 - Lovelock J.E.
Anal. Chem. 33:162, 1961
- 143 - Landown R.A., S.P. Lipsky.
Anal. Chem. 35:532, 1963

- 144 - Nicolis G.L., J.L. Gabrilove.
J. Clin. Endocr. 29:1519, 1969
- 145 - Clarck S.J., H.H. Wotiz.
Steroids 2:535, 1963
- 146 - Kittinger G.W.
Steroids 3:21, 1964
- 147 - Rapp J.P., K.W. Eik-Ness.
Analyt. Biochem. 15:386, 1966
- 148 - Palem M., C. Lapiere, P. Conninx, M. Margoulies.
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 15:851, 1970
- 149 - Avivi P., S. Simpson, J.F. Tait, J.K. Whitehead.
Radioisotope Conference 1:313, 1954
- 150 - Tait J.F., S.A.S. Tait, B. Little, K.R. Laumas.
J. Clin. Invest. 40:72, 1961
- 151 - Peterson R.E.
"Aldosterone" Blackwell Scientific Publ.
Oxford 1964, p. 145
- 152 - Bojisen E., H. Degn.
Acta Endocr. 37:541, 1961
- 153 - Brodie A.H., N. Shimizu, S.A.S. Tait, J.F. Tait.
J. Clin. Endocr. 27:997, 1967
- 154 - Coghlan J.P., B.A. Scoggins.
J. Clin. Endocr. 27:1470, 1967
- 155 - Yalow R.S., S.A. Berson.
J. Clin. Invest. 39:1173, 1960

- 156 - Murphy B.E.P.
Nature 301:679, 1964
- 157 - Murphy B.E.P.
J. Clin. Endocr. 27:973, 1967
- 158 - Fanestil D.
Karolinska Symposia - Steroid Assay
by Protein Binding.
Bogtrylkeriet Forum Copenhagen 1970, p. 275
- 159 - Lieberman S., B.F. Erlanger, S.M. Beiser, F.J. Agate.
Recent Progr. Hormone Res. 15:165, 1959
- 160 - Yalow R.S., S.A. Berson.
"Radioisotopes in Medicine"
U.S. Atomic Energy Commission,
Symposium Series n° 13, 1968, p. 7.
- 161 - Berson S.A., R.S. Yalow.
Clin. Chim. Acta 22:51, 1968
- 162 - Berson S.A., R.S. Yalow.
Metabolism 13:1135, 1964.
- 162 bis - Fernández-Cruz A.
4a. Reunión de la Sociedad Luso-Española de
Endocrinología, 2a. ponencia. Coimbra 1959
p. 688.
- 163 - Felber J.P.
Helv. Med. Acta 5:367, 1966
- 164 - Conn J.W.
Science. 158:525, 1967

- 165 - Conn J.W., D. Rovner, E. Cohen, J. Bookstein,
J. Cerny, C. Lucas.
Arch. Int. Med. 123:113, 1969
- 166 - Hewlett J.S., E.P. McCullagh, G.L. Farrell, H.P.
Dustau, E.F. Poutasse, W.L. Proudfit.
J.A.M.A. 164:719, 1957
- 167 - Luetscher J.A., B. Axelrad.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87:650, 1954
- 168 - Slaton P.E., M. Chamberlan, E. Biglieri.
J. Clin. Endocr. 29:239, 1969
- 169 - Spark R.F., S.L. Dale, P.C. Kahn, J.C. Melby.
J. Clin. Invest. 48:96, 1969
- 170 - Newton M.A., J.H. Laragh.
Arch. Int. Med. 123:147, 1969
- 171 - Milne M.D., R.C. Muehrcke, I. Aird.
Quart. J. Med. 26:317, 1957
- 172 - Relman A.S., W.B. Schwartz.
J. Clin. Invest. 36:923, 1957
- 173 - Luetscher J.A.
Medicine 43:437, 1964
- 174 - Strauss M.B., L.E. Earley.
Trans. Ass. Amer. Physicians 72:200, 1958
- 175 - Melby J.C.
"Clinical Endocrinology II".
ed. E.B. Astwood y C. Cassidy, Grune and
Stratton, New York 1968, p. 477.

- 176 - Birchall R., H.M. Batson.
J.A.M.A. 206:2144, 1968
- 177 - Conn J.W.
J.A.M.A. 183:871, 1963
- 178 - Lauler D.P., R. Hickler, G.W. Thorn.
New Eng. J. Med. 267:1136, 1962
- 179 - Grandchamp A., R. Veyrat, D. Scholer, A.F. Muller.
Helv. Med. Acta 35:55, 1969
- 180 - Crane M.G., J.J. Harris, J.E. Holloway.
J. Lab. Clin. Med. 61:51, 1963
- 181 - Wotman S., L. Baer, I.D. Mandel, J.H. Laragh.
Arch. Int. Med. 126:248, 1970
- 182 - Boyd D.W.
Lancet 1:594, 1970
- 183 - Endmonds C.J., P. Richards.
Lancet 2:624, 1970
- 184 - Wilson D.R.
Ann. Roy. Coll. Physns. Surg. Canada 311:22,1970
- 185 - Brown J.J., D.L. Davies, R. Fraser, J.I. Robertson,
R.H. Chinn, G. Dusterdieck, A.F. Lever, M. Tree,
A. Wiseman.
Lancet 2:55, 1968
- 186 - Biblieri E.G., P.E. Slaton, S.J. Kronfield, M. Schambelan
J.A.M.A. 201:510, 1967

- 187 - Robb C.A., J.O. Davis, C.I. Johnston, P.M. Hartroft.
Amer. J. Physiol. 216:884, 1969
- 188 - Dahl V., C. Bergada.
Medicina 29:11, 1969
- 189 - Guedon J.
Presse Med. 76:657, 1968
- 190 - Liddle G.W., L.E. Duncan, F.C. Bartter.
Amer. J. Med. 21:380, 1956
- 191 - Muller J.
Acta Endocr. 48:283, 1965
- 192 - Raiti S., A. Kowarsky, R.E. Morris, C.J. Migeon.
Bull. Johns Hopk. Hosp. 119:407, 1966
- 193 - Tucci J.R., E.A. Espiner, P.I. Jagger, G.L. Pank,
D.P. Lauler.
J. Clin. Endocr. 27:568, 1967
- 194 - Ganong W.F., E.G. Biglieri, P.J. Mulrow.
Recent Progr. Hormone Res. 22:381, 1966
- 195 - Spark R.F., S.J. Gordon, S.L. Dale, J.C. Melby.
Arch. Int. Med. 122:394, 1968.
- 196 - Llaurado J.G.
J.A.M.A. 167:1229, 1958.
- 197 - Muller J.
Acta Endocr. 52:515, 1966
- 198 - Bedsoe T., D.P. Island, G. Liddle.
J. Clin. Invest. 45:524, 1966

- 199 - Brown J.J., D.L. Davies, A.F. Lever, J.I. Robertson.
Lancet 2:278, 1963
- 200 - Cohen E.L., J.W. Conn, D.R. Rovner.
J. Clin. Invest. 46:418, 1967
- 201 - Miller R.E., A.J. Vandes, R.S. Kowalczyk, G. Geelhoed.
Amer. J. Physiol. 214:228, 1968
- 202 - Davis J.O., P.E. Biemion, T.C. Brown, C.I. Johnston.
Circulat. Res. Supl. 18:143, 1966
- 203 - Ford H.C., H.P. Pieters, R.E. Bailey.
J. Clin. Endocr. 28:451, 1968
- 204 - Weinberg M.H., A.J. Dowdy, G.W. Nokes, J.A. Luetscher.
J. Clin. Endocr. 28:359, 1968
- 205 - Best J.B., J.P. Coghlan, J.H. Bett, E.J. Cran.
Lancet 2:1353, 1971
- 206 - Bull M.B.
Circ. Res. 27:953, 1970
- 207 - Fabre L.F., R.W. Farmer, H.W. Davis.
Circ. Res. 24:893, 1969
- 208 - Gordon R.D., O. Kuchel, G.W. Liddle.
J. Clin. Invest. 46:599, 1967
- 209 - Mogil R.A., J.H. Russell, J.J.
Invest. Urol. 7:442, 1970

- 210 - Vander A.J., J.R. Luciano.
Circulat. Res. Suppl. 21:69, 1967
- 211 - Blair-West J.R., J.P. Coghlan, D.A. Denton.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46:525, 1968
- 212 - Balikian H.M., A.H. Brodie, S.L. Dale, J.C. Melby.
J. Clin. Endocr. 28:1630, 1968
- 213 - Gowenlock A.H., J.N. Mills, S. Thomas.
J. Physiol. 146:133, 1959
- 214 - Horky K., O. Kuchel, J. Marek.
Caslek. Ces. 108:1557, 1969
- 215 - Cohen E.L., D.R. Rovner, J.W. Conn.
J.A.M.A. 197:973, 1966
- 216 - Brown J.J., D.L. Davies, A.F. Lever, D. McPherson.
J. Robertson.
Clin. Sci. 30:279, 1966
- 217 - Kaplan N.M.
"Angiotensin Systems and Experimental Renal
Diseases"
Ed. J. Metcalf, Little Brown Co. Boston
1963, p. 97
- 218 - Davis J.O., J. Urguhart, J.T. Higgins.
J. Clin. Invest. 42:597, 1963
- 219 - Bartter F.C., I.H. Mills, E.G. Biglieri, C. Delea
Recent Progr. Hormone Res. 15:311, 1959

220 - Gann D.S., C.S. Delea, J.R. Gill, J.P. Thomas, F.
C. Bartter.

Amer. J. Physiol. 207:104, 1964

221 - Josephson B., J. Bergstrom, H. Bucht, E. Hultman.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 14:47, 1962

222 - Funder J.W., V.R. Blair-West, J.P. Coghlan.

Endocrinology 85:381, 1969

223 - Maebashi M., Y. Miura, K. Yoshinaga.

Jap. Circult. J. 32:1265, 1968

224 - Albrecht P.H., A.J. Vandes.

J. Clin. Invest. 49:1510, 1970

225 - Vandes A.J.

Amer. J. Physiol. 219:455, 1970

226 - Sealey J.E., I. Clark, M.B. Ball, J.H. Larach

J. Clin. Invest. 49:2119, 1970

227 - Newsome H.H., F.C. Bartter.

J. Clin. Endocr. 28:1704, 1968

228 - Ginn H.E., R. Cade

Physiologist 4:40, 1961

229 - Ginn H.E., R. Cade, T. McCallum, M. Fregley.

Endocrinology 80:969, 1967

- 230 - Blair-West J.R., J.P. Coghlan, D.A. Denton,
J.R. Goding, M. Wintour, R.D. Wright.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46:371, 1968
- 231 - Palmore W.P., P.J. Mulrow.
Science 158:1482, 1967
- 232 - Lee T.C., B. Van Der Val, D. De Wield.
J. Endocr. 42:465, 1968
- 233 - Williams G.H., L.I. Rose, R.G. Dluhy.
J. Clin. Endocr. 32:27, 1971
- 234 - Davis J.O., E. Anderson, C.J. Carpenter, C.R. Ayers,
W. Haymaker, W.T. Spence.
Amer. J. Physiol. 200:437, 1961
- 235 - Ganong W.F., A.H. Lieberman, W.J. Daily, V.S. Yuen,
P.J. Mulrow, J.A. Luetscher, R.E. Bailey.
Endocrinology 65:18, 1959
- 236 - Blair-West J.R., J.P. Coghlan, D.A. Denton, J.R.
Goding, M. Wintour, R.D. Wright.
Recent Progr. Hormone Res. 19:311, 1963
- 237 - Carpenter C.J., J.O. Davis, C.R. Ayers.
J. Clin. Invest. 40:1160, 1961
- 238 - Davis J.O., N.A. Yankipoulos, J. Holman.
Amer. J. Physiol. 197:207, 1959
- 239 - Edmonson P.C., N. Joels.
J. Physiol. 202:82, 1969
- 240 - Burstyn P.G., D.F. Harrobin.
Lancet 1:973, 1970

- 241 - Muller A.F., E.L. Manning, A.M. Riondel.
"Aldosterone" A.F. Muller Ed. Little Brown
Co. Boston 1958, p. 111
- 242 - Bartter F.C., C.S. Delea, F. Halberg.
Ann N.Y. Acad. Sci. 98:969, 1962
- 243 - Luetscher J.A., A.J. Dowdy, A.R. Arnstein,
C.P. Lucas, C.L. Murray.
"Aldosterone", E. Bailien y P. Pobel.
Eds. Blackwell Scientific Publ.
Oxford 1964, p.487.
- 244 - Luetscher J.A., A.H. Lieberman.
Arch. Int. Med. 102:314, 1958
- 245 - Wolfe L.K., R.D. Gordon, D. Island, G.W. Liddle.
J.Clin. Endocr. 26:1261, 1966
- 246 - Gordon R.D., L.K. Wolfe, D.P. Island, G.W. Liddle.
J. Clin. Invest. 45:1587, 1966
- 247 - Davis J.O., C.J. Carpenter, C.R. Ayer, J.E. Holman,
R.C. Bahn.
J. Clin. Invest. 40:684, 1961
- 248 - Ganong W.F., P.J. Mulrow.
Nature 190:115, 1961
- 249 - Blair-West J.R., J.P. Coghlan, D.A. Denton,
J.R. Goding, M. Wintour, R.D. Wright.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46:295, 1968
- 250 - Bailey G.M., C.L. Hampers, J. P. Merrill,
R.H. Underwood, D.P. Lauler, G.H. Williams,
J.R. Blair-West, J.P. Coghlan, D.A. Denton,
B.A. Scoggins, D. Wright.
En preparación.

- 251 - Cade R., T. Perenick.
Amer. J. Physiol. 208:1026, 1965
- 252 - Bojisen E.
Europ. J. Steroids 1:145, 1966
- 253 - Steimacker H.G., P. Veesei, D. Lounner, H.P. Wolff.
Acta Endocr. 58:630, 1968
- 254 - Palmore W.P., P.J. Mulrow.
Endocrinology 84:1342, 1969
- 255 - Haning R., J. McCracken, M. St. Cyr, G. Williams,
G. Abraham.
En preparación.
- 256 - Freier E.F., V.L. Rausch.
Univ. Minn. Med. Bull. 29:190, 1968
- 257 - Lewbart M.L., V.R. Mattox.
Anal. Chem. 33:559, 1961
- 258 - Gunnels J.C., C.E. Grim, R.R. Robinson, N.M. Wilderma
Arch. Int. Med. 119:232, 1967
- 259 - R. Fraser, V.H.T. James.
J. Endocr. 40:59, 1968
- 260 - Nowaczrnsky W., J. Silah.
Un. med. Canada 95:210, 1966
- 261 - Wolff H.P., M. Torbica.
Lancet 1:1346, 1963
- 262 - Bayard F., A. Kowarsky, V. Weldor, C.J. Migeon.
J. Lab. Clin. Med. 75:345, 1970

- 263 - Kono T., T. Mikaye.
Proc. 2nd Int. Congr. Endocr. Londres 1964, p.246.
- 264 - Vecsei P., G. Dusterdieck, J. Jahnecke, D. Lommer,
H.P. Wolff.
Clin. Sci. 36:241, 1969
- 265 - D. Mayes, S. Furuyama, D.C. Kem, C.A. Nugent.
J. Clin. Endocr. 30:682, 1970
- 266 - Bayard F., I.Z. Beitins, A. Kowarsky, C.J. Migeon.
J. Clin. Endocr. 31:1, 1970
- 267 - Bayard F., C.R. Cooke, D.J. Tiller, I.Z. Beitins,
A. Kowarsky, G. Walker, C.J. Migeon.
J. Clin. Invest. 50:1585, 1971
- 268 - Champlain J., J. Genest, R. Veyrat, R. Boucher.
Arch. Int. Med. 117:355, 1966
- 269 - Page L.B., E. Haber, A. Kimura, A. Purnode.
J. Clin. Endocr. 29:200, 1969
- 270 - Boyd G.W., A. Adamson, V.H. James, W.S. Peart.
Proc. R. Soc. Med. 62:1253, 1969
- 271 - Catt K.J., M.D. Cain, J. Coghlan, P. Zimmet, E.J.
Cran, J.B. Best.
Circulation Res. 27 suppl. 2 :177, 1970
- 272 - Biglieri E.G., J.R. Stockigt, M. Schamberlain.
Arch. Int. Med. 126:1004, 1970

- 273 - Ferris J.B., J.J. Brown, R. Fraser, A.W. Kay,
A.M. Neville, I.G. O'Muircheartaigh, J.I. Robertson,
T. Symington, A. Lever.
Lancet 2:995, 1970
- 274 - Kem D.C., M.H. Weinberg, D.H. Mayes, C.A. Nugent.
Arch. Int. Med. 128:380, 1971
- 275 - Conn J.W., R. Knopf, R. Nesbit.
Amer. J. Surg. 107:159, 1964
- 276 - Gleadle R.I., J.J. Brown, J.R. Curtis, R. Fraser,
D. Lawson, A.F. Lever, A.L. Linton, S. Mc Veigh,
J.I. Robertson, H.E. De Wardener, A.J. Wing.
Proc. Europ. Dialysis and Transplant Ass.
6:131, 1969
- 277 - Blair-West J.R., J.P. Coghlan, D.A. Denton, J.A. Munro,
E. Wintour, R.R. Wright.
J. Clin. Invest. 43:1576, 1964
- 278 - Hannon R.C., R.P. Deruyck, J.V. Jousens, A.K. Amery
J. Clin. Endocr. 29:1420, 1969
- 279 - Michelakis A.M., H. Mizukooshi.
J. Clin. Endocr. 33:27, 1971
- 280 - Blanfox M.D., A.E. Birban, R.B. Hickler, J.P. Merrill.
New Eng. J. Med. 275:1165, 1966
- 281 - Capelli J.P., L.G. Wesson, G.E. Aponte, C. Faraldo,
E. Jaffe.
J. Clin. Endocr. 28:221, 1968
- 282 - McKenzie J.K., J.Z. Montgomerie.
Nature 223:1156, 1969
- 283 - Majoor C.L., F.M. Schlatmann, A.P. Jansen, H. Prenen
Clin. Chim. Acta 5:591, 1960

- 284 - Bailey R.E., H.C. Ford.
Acta Endocr. 60:249, 1969
- 285 - Casparie A.F., T.F. Benraad, P.W. Kloppenborg, C.L. Majoor.
Acta Endocr. Suppl. 119:140, 1967
- 286 - Conn J.W., D.R. Rovner, E.L. Cohen, J.E. Anderson.
J. Clin. Endocr. 26:527, 1966
- 287 - Sealey J.E., J.N. Gerten, J.G. Ledingham, J.H. Laragh.
J. Clin. Endocr. 27:699, 1967
- 288 - Michelakis A.M., R. Horton.
Circ. Res. Suppl. 26:175, 1970