

R. esp. Fisiol.
Tomo VI, núm. 2, páginas 87 a 101, 1950.

Facultad de Medicina de Barcelona. – Cátedra de Patología Médica
(Prof. M. Soriano)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas. – Sección de Patología Interna

Nuestra experiencia en la técnica para la valoración del poder antidiurético de los humores orgánicos

por M. Soriano y J. Campistol

(Recibido para publicar el día 12 de abril de 1950)

Los primeros estudios en el campo biológico, acerca de una substancia antidiurética segregada por el lóbulo posterior de la hipófisis, fueron dirigidos a la valoración de sus extractos en relación con este poder antidiurético.

Hasta entonces la valoración de los mismos, se hacía única y exclusivamente en relación con su poder occitócico, según la técnica expuesta por Dale en 1912 (3), puesto que, inseparadas aún las substancias con poder occitócico de las que lo tenían vasopresor y antidiurético, se contaba con un método lo suficientemente preciso de valoración de tales extractos. Burn (1), quince años más tarde, fué quien pensó en la posibilidad de simplificar el método de Dale, haciéndolo en relación con el poder antidiurético en lugar de valorar el occitócico, como se había venido realizando hasta entonces.

En 1928 hace su primera publicación, conjuntamente con Gaddum y Bijlsma, usando al hombre para sus experiencias. Pronto pudieron convencerse de las dificultades que esto tenía, sobre todo al no poderlo llevar a cabo en el número suficiente de casos que una buena técnica comparativa exigía. Por eso lo abandonó pronto, dirigiendo sus miradas hacia la experimentación animal, en la que Gibbs (4) le había precedido, intentándolo en ratones.

Adopta en sus experiencias las ratas, por una serie de razones que expone con claridad en su artículo aparecido en el año 1931 y que puede considerarse como la piedra fundamen-

tal, sobre la que descansa todo el edificio de los ensayos bio-clínicos que sobre esta substancia se han realizado en los últimos años.

Ello explica que nos detengamos algo en este trabajo. Parte Burn de dos premisas fundamentales. Al administrar a las ratas conjuntamente agua y una substancia con poder antidiurético, esta última es capaz de inhibir la eliminación de la primera durante un tiempo proporcional a la cantidad de substancia activa que el citado extracto contenga.

No queda, pues, más que llevar a la práctica estas premisas fundamentales. Someter a las ratas a estas dos influencias y valorar los resultados, midiendo naturalmente el tiempo durante el cual las ratas han tenido inhibida su diuresis, procurando crear las condiciones óptimas para que estos resultados tengan una exactitud y precisión tan constante como exige todo método de valoración biológica.

La aparición de esta técnica fué el punto de partida de una serie de investigaciones orientadas hacia la clínica, pretendiendo, primero, demostrar la naturaleza y presencia de estas substancias antidiuréticas en individuos normales, y posteriormente demostrarla en diversos estados patológicos a fin de poder precisar su etiopatogenia.

Al principio, se buscaba esta substancia en la sangre con todos los inconvenientes que ello representaba (escasa concentración, limitada extracción, difícil manipulación, etc.), pero posteriormente y una vez demostrado su paso por el glomérulo y su excreción por la orina, medio en el que, al parecer, conserva toda su acción (Gilman y Goodman) (5), se abandonaron los primitivos procedimientos y se adoptó por la mayoría de autores este último humor para la investigación de esta substancia. Nosotros, como más tarde veremos, hemos adoptado sistemáticamente su búsqueda en la orina por las ventajas que ello reporta y la regularidad de los resultados que sucesivamente hemos ido obteniendo, pero no hemos despreciado los líquidos trasudados de los enfermos edematosos, en los que la hemos encontrado en proporción casi siempre superior a la existente en la orina del mismo enfermo.

El estado patológico más profusamente estudiado en este sentido por distintos autores ha sido el de la eclampsia gravídica, siendo varios los que han trabajado en estos asuntos, y quizás Krieger y Kilvington (7-8), los que lo han hecho con más detalle y profundidad, a pesar de lo cual no han podido llegar a conclusiones definitivas, lo que nos explicamos nosotros, entre otras razones, por haber abandonado el examen en la orina que utilizaban al principio y haber adoptado el de la

sangre con el cúmulo de inconvenientes que ello reporta, además de utilizar una técnica harto complicada y en la que es muy difícil que la substancia antidiurética conserve toda su actividad.

El otro estado patológico objeto de estos estudios ha sido el de los síndromes edematosos, el cual, sin embargo, ha merecido la atención de pocos autores, siendo quizás Robinson y Farr (9), los que presentan la mayor estadística con diez casos con edema, y si bien encuentran cierta relación entre la presencia de edema clínico y de substancia antidiurética en la orina, se quejan de inconstancia en los resultados, lo que nos explicamos fácilmente, por su método de concentración que realizan por ultrafiltración a través de una membrana de celofán, con lo cual, según las modernas investigaciones de Amat (10) y otros eminentes autores, debe quedar, por este procedimiento, una considerable cantidad de substancia retenida en los poros de las membranas, alterando profundamente los resultados.

Finalmente otro grupo de investigadores han utilizado la concepción y aún la técnica de Burn para el estudio de las relaciones, en cuanto a procedencia, que pueda tener esta substancia antidiurética encontrada en la orina y en la sangre, con referencia al lóbulo posterior de la hipófisis, y en este aspecto son fundamentales los trabajos realizados por Gilman y Goodman en las ratas y los de Hare en perros.

Métodos

Nuestra técnica consta de dos partes fundamentales. La primera relativa a la preparación del líquido problema, a fin de colocarle en las condiciones más oportunas para valorar su poder antidiurético en las ratas, y la segunda, en la valoración biológica propiamente dicha de este líquido, mediante su inyección a las ratas y evaluación de su poder inhibidor de la diuresis en las mismas.

En la primera parte tienen que resolverse dos problemas. Uno, el lograr la mayor concentración posible de esta substancia en el líquido problema, a fin de hacer más patentes sus efectos, concentración que, naturalmente, debe realizarse siempre en idénticas proporciones a fin de poder relacionar todas las determinaciones.

El segundo problema a resolver consiste en liberar a este líquido de todas aquellas substancias que, ya meramente por su presión osmótica, ya por su conocida influencia sobre la diuresis (concretamente, sales y urea presentes abundantemente en la orina y en las que se ha demostrado, además, un poder

inhibidor de la acción antidiurética retrohipofisaria), pudieran interferir esta acción antidiurética que buscamos y enmascarar los resultados.

La naturaleza proteica de la substancia antidiurética, aceptada por todos los autores, permite utilizar la ultrafiltración o diálisis para separar los cristaloides interferentes.

Al principio realizábamos esta separación por una filtración a través de membranas de colodión que nosotros mismos nos preparábamos disolviendo nitrocelulosa en alcohol y éter, en proporciones adecuadas, vertiendo después esta solución en probetas graduadas o tubos de ensayo, para obtener los bolsos de ultrafiltración del tamaño deseado.

Sin embargo, una serie de resultados paradójicos nos obligó a un repaso de las condiciones en que realizábamos esta ultrafiltración, encontrando dos causas de error fundamentales. La gran variedad del tamaño de los poros de las membranas de colodión, dependiente sobre todo de las condiciones de preparación de las mismas, y principalmente una considerable retención de substancia activa en la membrana ultrafiltrante por adsorción, fenómeno que desconocíamos y que nos fué revelado al consultar los tratados referentes a estos fenómenos y los trabajos del Profesor Amat de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Por esta causa y al objeto de sustituir la ultrafiltración por diálisis, a la vez que simplificar la técnica, abandonamos las membranas de colodión adoptando las de celofán corriente, previamente desprovistas de la glicerina que contienen, por inmersión durante veinticuatro horas en un baño de agua. Los poros extremadamente pequeños del celofán (aunque de diámetro no perfectamente conocido) nos daban una total seguridad en la retención de substancias de naturaleza coloide, permitiendo en cambio sobradamente el paso a las pequeñas moléculas de los cristaloides.

Eliminadas pues por diálisis estas substancias cristaloides, nos queda el problema de la concentración de los coloides retenidos, lo cual realizábamos al principio como etapa previa a la citada diálisis, mientras que en la actualidad lo hacemos simultáneamente, con lo que, además de ganar mucho tiempo, logramos que a medida que el agua del líquido problema se va evaporando, se mantenga dentro de ciertos límites el desequilibrio de presiones osmóticas de los líquidos que vamos a dializar, con lo cual naturalmente se facilita ésta.

Logramos la concentración sometiendo la superficie libre del líquido problema a la acción de la corriente de aire de un ventilador, a la vez que mantenemos la temperatura constante

(20° C.) mediante una estufa eléctrica colocada convenientemente.

Se nos presentó un problema con esta nueva técnica, consistente en la frecuente aparición en las ratas, de estados tóxicos muchas veces mortales (también citados por otros autores) que no podían ser atribuidos más que a haber trabajado sin precauciones de asepsia, con la más que probable proliferación y contaminación bacteriana. Se trataba de encontrar un bactericida efectivo y que no fuera tóxico, ni influyente sobre la diuresis de las ratas. Nos solucionó el problema satisfactoriamente el empleo de una solución al uno por mil de merthiolato sódico (etil-mercuri-tiofenil-ortocarboxilato sódico), substancia estable a la luz y al aire y que no precipitaba las albúminas. Hemos podido descartar su acción tóxica sobre las ratas (10 cc. al 5 %, en inyección intraperitoneal no les produce trastorno alguno), así como su posible influencia sobre la diuresis, pues a pesar de poseer en su molécula mercurio, éste se inyecta a dosis tan reducidas (menos de una décima de milígramo por cada animal de la experiencia), que no muestran alteración alguna; además, y con precaución, usamos las ratas solamente una o dos veces por semana, cambiándolas cada mes, y realizamos con ellas pruebas testigo de su diuresis. Sin embargo, actualmente sólo añadimos el merthiolato a las orinas que sospechamos puedan tener una acción infectante.

Recogemos pues la orina del enfermo (a ser posible en ayunas y evitando naturalmente la restricción previa de líquidos) en cantidad de 150 centímetros cúbicos, en un recipiente limpio que contiene 2 cc de ácido acético, a fin de que, haciendo la mezcla ligeramente ácida, facilitar su conservación. Cuando es necesario añadimos 5 cc. de la solución al uno por mil de merthiolato sódico y mezclando bien todas estas substancias, con lo cual ya tenemos la orina preparada para la diálisis y concentración simultáneas.

Si en lugar de orina trabajamos con otros líquidos orgánicos (exudados o trasudados), las operaciones se simplifican mucho, puesto que su contenido en sales y urea es muy escaso y por tanto una ligera diálisis es suficiente para eliminar estas substancias. Los recogemos en un recipiente que contiene citrato sódico en proporción adecuada para evitar su coagulación y luego añadimos el merthiolato sódico para impedir la proliferación bacteriana.

Con la membrana de celofán cerramos herméticamente el fondo de un dializador cilíndrico, que tiene aproximadamente unos 30 cm. de diámetro, y colocamos en su interior el líquido problema, que previamente habremos preparado, introducién-

dolo en un cristalizador que contiene aproximadamente un litro y medio de agua destilada, procurando que el nivel en el dializador sea algo más elevado que el del cristalizador a fin de evitar el reflujo de líquidos de este último al primero, que nos perturbaría la concentración. De este modo enfrentamos los dos líquidos a través de la membrana semipermeable y, gracias a la considerable diferencia de presión osmótica que se establece, tiene lugar rápidamente la diálisis, la cual, naturalmente, se continúa todo el tiempo que dura la concentración, puesto que se va sosteniendo, dentro de ciertos límites, la diferencia de presión osmótica al evaporarse progresivamente el agua del líquido problema.

A fin de hacer más efectiva la diálisis, o bien renovábamos el agua destilada a la mitad de la prueba, es decir, a las seis horas, con lo cual renovamos de modo considerable el desequilibrio de presiones osmóticas y facilitamos la salida de las sales y urea del líquido problema, o bien, como hacemos actualmente, disponemos una corriente continua de agua a través de un tubo de goma que va a parar al cristalizador.

Con este procedimiento, dado el tiempo durante el cual se realiza la constante variación de las presiones osmóticas, y la considerable cantidad de líquido existente en el cristalizador (más de un litro), se logra fácilmente la eliminación de los cristaloides del líquido problema, de modo que, a pesar de la concentración alcanzada por evaporación (el líquido final tiene sólo 1/10 a 1/20 de la cantidad inicial), las cifras de cloruros y urea se reducen siempre a proporciones inferiores al medio gramo por mil.

Ya tenemos pues el líquido problema concentrado y dializado, es decir, preparado para su valoración biológica, para ser inyectado a las ratas y estudiar su acción sobre la diuresis. Nos queda, pues, por estudiar, cómo se realiza esta valoración biológica. Hemos dicho más arriba que el trabajo fundamental en este aspecto es el de J. H. Burn, dirigido a la valoración de extractos de hipófisis posterior y que, según este autor, es superior al de útero aislado en relación con su poder occitócico.

Hemos adoptado, como Burn, ratas machos, de peso comprendido entre 100 y 200 gramos, por su cómodo ensayo, fácil reproducción y crecimiento, económica alimentación y relativa constancia en sus respuestas, desechando las hembras por haber observado, al igual que este autor, una menor regularidad en su diuresis.

Agrupamos a las ratas en grupos de cuatro, cuya diuresis hemos comprobado previamente, así como su respuesta a la ingesta de agua. Las dejamos desde el día anterior con res-

tricción alimenticia (durante 12 horas, es decir, desde que comienza la diálisis-concentración), aunque dejándoles el agua, con lo cual hemos podido comprobar que sus respuestas son más constantes, lo que puede atribuirse en primer lugar a que la absorción de agua tiene que ser más fácil en un intestino libre de alimentos, y en segundo lugar, a que al permitirseles tomar agua no se produce déficit en el metabolismo de la misma, lo que podría conducirnos a falsos resultados positivos (Gilman y Goodman).

Tiende también a evitar estados de deshidratación en las ratas el administrarles por vía oral, dos horas antes de la prueba, una cantidad de agua equivalente al 2,5 % de su peso (como aconseja Klisiecki), pues se comprenderá fácilmente que es la deshidratación el principal enemigo de la veracidad de estas pruebas, puesto que si en realidad existe una carencia de agua, es lógico que la administrada por vía oral se retenga y no sea eliminada por la orina, con lo que fácilmente podría interpretarse como antidiuresis, lo que en realidad no es más que una oliguria causada por la deshidratación.

Realizamos la hidratación de las ratas mediante un método sencillo y práctico, que suma la rapidez a la facilidad de ejecución, permitiendo además su realización por una sola persona, condiciones no reunidas por los métodos empleados por los otros autores, cuyos trabajos hemos podido consultar.

Se trata sencillamente de emplear una aguja de grueso calibre, a la cual hemos suprimido la punta para evitar su acción traumatizante, y dado una dirección acodada, en bayoneta, para así adaptar su forma a la disposición y dirección de las regiones anatómicas que tiene que atravesar.

Adaptamos esta aguja a una jeringa de 10 cc., la cual, una vez cargada con el agua correspondiente, cogemos con la mano derecha, mientras que con el pulgar e índice de la mano izquierda sostenemos el animal por pinzamiento de la piel de su dorso y cuello, obligándole al mismo tiempo a una hiperextensión de la cabeza, a fin de hacer menos sinuoso el camino a seguir. La introducción de la aguja, por encima de la lengua y siguiendo la pared posterosuperior de la faringe, no tiene dificultad alguna, realizándose corrientemente sin la más ligera protesta del animal, a menos, claro está, que introduzcamos el extremo de la aguja en su abertura glótica, lo cual notaremos además por dificultades en la inyección del agua e inmediatos síntomas de asfixia. Si la aguja está bien colocada y mantenemos el animal inmóvil durante la inyección, ésta se realiza con toda facilidad en menos de quince segundos, siendo muy frecuente el que la hidratación de un grupo de cuatro ratas no

sobrepase el tiempo de un minuto, tiempo sumamente reducido si se compara con el empleado por Burn, que excede del minuto por rata de la experiencia, además de precisar un ayudante para la introducción de la sonda flexible de goma en el esófago de la rata.

Una vez realizada esta primera hidratación, colocamos a los grupos de cuatro ratas en jaulas especiales para recoger la orina, que tienen el suelo de tela metálica (de espesor suficiente para impedir el paso de los excrementos), terminando en un embudo destinado a conducir la orina que atraviesa dicha tela metálica a un recipiente graduado colocado debajo. La medición de la cantidad de orina excretada por las ratas durante estas dos horas viene a ser una prueba de dilución realizada en estos animales antes de la experiencia propiamente dicha, y nos da datos acerca de su estado de hidratación y de su funcionamiento normal, los cuales, de resultar alterados, nos inducirán a desechar tales animales o, por lo menos, a tenerlo en cuenta al enjuiciar los resultados finales.

Durante estas dos horas, se considera normal una diuresis superior a la mitad del agua ingerida e inferior al total de la misma, de modo que todas las cifras superiores o inferiores a las mismas deben ser motivo de alarma y estudio de las condiciones en que se realice la experiencia.

A las dos horas de realizada la primera hidratación de las ratas, procedemos a realizar la prueba biológica propiamente dicha, y para ello recogemos el líquido problema contenido en el dializador (procurando arrastrar todo el sedimento), y medimos su cantidad, de la cual inyectamos intraperitonealmente a cada rata, la octava parte. Esta división del concentrado-dializado en ocho partes, nos permite no sólo la distribución homogénea del líquido problema, sino también el administrar a los dos grupos de cuatro ratas, que usamos en cada experiencia, la totalidad del concentrado correspondiente a los 150 cc. iniciales, lo que nos permite poder relacionar entre sí todos los resultados obtenidos al referirlos siempre a la misma cantidad inicial de líquido problema.

Hemos dicho que usamos en la experiencia dos grupos de cuatro ratas, y así buscando el promedio de los resultados de ambos grupos, llevamos al mínimo la natural variación biológica, procurando, además, disminuir los factores de error, desechando aquellas pruebas cuyos resultados en uno u otro grupo son anormalmente dispares.

La inyección intraperitoneal la realizamos también sin precisar de ayudante, pinzando entre los dedos índice y medio de la mano izquierda, el cuello de la rata, mientras que el meñi-

que de la misma mano coloca en abducción la extremidad inferior izquierda del animal, y así presentándose libre la fosa ilíaca izquierda, podemos realizar con facilidad en ella la inyección intraperitoneal, habiendo podido comprobar repetidamente que la posibilidad de atravesar la pared intestinal e inyectar el líquido en su interior es muy remota, pues las asas se deslizan fácilmente al contacto de la aguja («huyen»), sin dejarse atravesar por una punta, que procuramos no sea muy afilada.

Corrientemente, la cantidad del concentrado-dializado suele oscilar entre 15-30 cc., es decir, $1/10$ $1/20$ de la cantidad inicial, lo cual, repartido entre las ratas, viene a corresponder a 2-3 cc. a cada una.

Una vez realizada la inyección intraperitoneal hay que proceder a la hidratación definitiva con una cantidad de agua correspondiente al 5 % del peso de cada rata, operación que se realiza idénticamente a la referida anteriormente.

Terminadas todas estas operaciones y colocadas las ratas en grupos de a cuatro en las jaulas correspondientes, no nos queda más que recoger la orina fraccionada de cada cuarto de hora, midiendo su cantidad y, si es necesario, su densidad, dando por terminada la prueba cuando la cantidad total de orina eliminada por cada grupo llega al 2'5 % del peso de las ratas que lo componen, es decir, a la mitad del agua que se les inyectó en la hidratación definitiva.

Dado el modo como transcurren las pruebas positivas, con una primera fase de oliguria (por predominio de la acción antidiurética), y una segunda de poliuria en que sobreviene la descarga del agua retenida en el organismo, existen diversos procedimientos para dar los resultados de la misma.

El más sencillo es, sin duda, el diferenciar escuetamente las pruebas positivas de las negativas, es decir, afirmación o negación del poder antidiurético en determinado humor.

La cosa se complica mucho más al pretender dar los resultados cuantitativos, es decir, no limitarse a afirmar o negar la presencia de substancia antidiurética en determinado humor, sino precisar la cantidad existente de la misma. Si hemos dicho que el tiempo que dura la inhibición de la diuresis está en razón directa con la cantidad de substancia antidiurética administrada, es lógico que el resultado pueda darse midiendo el tiempo durante el cual la rata ha permanecido oligúrica. Sin embargo, esto tan sencillo se complica mucho al llevarlo a la práctica, puesto que existen numerosos estados intermedios (a veces bastante prolongados) en los que no es nada fácil una clara diferenciación del momento en que cesa la oli-

guria, fenómeno además fácilmente comprensible al considerar que los datos pertenecen a grupos de a cuatro ratas y que, por tanto, es muy posible que la oliguria no tenga en las mismas una duración exactamente igual.

Por eso la mayoría de autores se han inclinado a aceptar otra medida, la del tiempo que tarda la rata en eliminar una determinada cantidad de agua ingerida. Esto, naturalmente, tiene un grave inconveniente, y es que este tiempo, así considerado, depende en buena parte de la rapidez y volumen de la descarga acuosa que se producirá precisamente cuando cese la acción antidiurética. Por eso nosotros nos hemos unido al grupo de autores que limitan el tiempo al necesario para eliminar solamente la mitad del agua ingerida, cantidad a la que se llega muy rápidamente en cuanto se inicia la descarga, y así logramos reducir al máximo la influencia de ésta.

Este tiempo así considerado, nos da una cifra útil de valoración del poder antidiurético de un líquido problema, estando además al margen de apreciaciones personales, lo que ocurría con los sistemas anteriores.

Al realizar el cálculo de este *tiempo de diuresis* hay que tener en cuenta que despreciamos la orina eliminada durante el primer cuarto de hora de la prueba, por considerar que está aún fuera de la influencia del experimento. Además, cuando sumada la última determinación sobrepasa algo la cantidad tope, practicamos una sencilla proporción con estos últimos datos a fin de precisar exactamente que el tiempo dado como resultado corresponda al de eliminación justa de la cantidad citada.

Este tiempo de diuresis nos expresa, en cifras concretas, el poder antidiurético de determinado líquido orgánico que hayamos ensayado, y nos permite, por tanto, la comparación de los diversos humores entre sí, en relación al citado poder, puesto que partimos para todos ellos, de una misma cantidad inicial: ciento cincuenta centímetros cúbicos.

Esto nada tiene de objetable en cuanto se refiere a los líquidos de edema y trasudados serosos, pero no ocurre lo mismo en las pruebas realizadas con orina, dada la variabilidad de las cantidades eliminadas de la misma, no sólo en días distintos, sino incluso en las diferentes horas del día.

Se comprende que la cantidad de principio antidiurético eliminado por la orina dependa de la cantidad del mismo circulante por el organismo, mientras que su concentración en la misma dependerá, además, de la cantidad de orina eliminada y, por tanto, el poder antidiurético de 150 cc. de orina no reflejará exactamente la cantidad de principio antidiurético circu-

lante por el organismo, si no tenemos en cuenta la diuresis en un tiempo concreto y relacionamos con ella los 150 cc. tomados como muestra de la misma.

Y es natural que así deba ser, puesto que el organismo en un tiempo determinado se desembarazará de una determinada cantidad de substancia antidiurética, cuya proporción en la orina dependerá de la cantidad de orina eliminada durante este tiempo, que de no ser tenida en cuenta, haría erróneos los resultados obtenidos.

Sin embargo, el error es mucho menor de lo que a primera vista parece, y ello se debe a que la influencia entre ambos factores es recíproca, es decir, que si bien es cierto que la concentración de principio antidiurético en la orina depende de la cantidad de ésta en que está contenido, es también innegable que el principio antidiurético influye fundamentalmente en la diuresis, haciendo que (naturalmente dentro de la variabilidad biológica) las altas concentraciones del mismo, vengán a coincidir con escasas cantidades de orina de concentración muy elevada.

Y es muy frecuente en los estados edematosos que las cantidades de orina eliminadas en el período de estado sean mínimas y, por tanto, con variación escasa entre sí, sobreviniendo, en cambio, las variaciones cuando comienzan la eliminación del edema y las grandes diuresis, ocasiones en que con toda lógica hay que suponer la desaparición o por lo menos gran disminución de la substancia antidiurética circulante por el organismo, ya que de existir y conservar su actividad, no es posible concebir tales diuresis.

Además, y para terminar, veamos como estas afirmaciones nuestras vienen confirmadas en la práctica por tres hechos fundamentales :

1) En las numerosas pruebas patrón realizadas con orina de individuos normales, a pesar de la gran variabilidad de sus diuresis, las variaciones en el tiempo de diuresis nunca han sido superiores a 100 minutos, ni inferiores a 50, variación como vemos muy escasa, si la comparamos con la de las cantidades de orina eliminadas.

2) La coincidencia y aun relativo paralelismo que hemos encontrado en el poder antidiurético de los líquidos trasudados y la orina del mismo enfermo.

3) El cálculo que hemos realizado en varios casos, teniendo en cuenta la diuresis durante 24 horas, encontrando que las proporciones existentes al comparar los resultados obtenidos con 150 cc. de orina de dos enfermos distintos, eran mantenidas al hacerlo con las diuresis de todo el día.

Por tanto, creemos que el posible error motivado por esta causa es poco importante y no precisa ser tenido en cuenta.

Decíamos hace un momento, que en algunas ocasiones creíamos oportuna la medición de la densidad de las orinas fraccionadas, lo que realizamos cuando sospechamos falsas positividades, es decir, que la oliguria presentada por las ratas no fuera producida por substancias antidiuréticas, sino por otras causas. Naturalmente, la medición de las densidades en estos casos tiene un interés decisivo, puesto que en las oligurias producidas por substancias con poder antidiurético, las densidades de la orina excretada son muy elevadas, lo que no ocurre en otros casos, por ejemplo, las producidas por acciones tóxicas sobre el riñón, y, por tanto, una prueba que consideramos positiva, deja de serlo si se comprueban densidades bajas en sus orinas fraccionadas.

Dado que el método de determinación de densidades con cantidades tan exiguas de líquido es bastante engorroso, se comprende que complicaría mucho las pruebas al realizar esta determinación en cada una de las fracciones de orina, y por eso sólo lo usamos en los casos dudosos, en que sospechamos de la veracidad de los resultados obtenidos.

El fundamento de la técnica que nosotros utilizamos se basa en observar el comportamiento de una gota del líquido problema, en este caso la orina de las ratas de la experiencia, frente a un preparado no miscible con ella y de densidad conocida.

Hemos encontrado como mezcla más apropiada, la de cloroformo y benzol, por reunir la misma las propiedades anteriores y tener además estos líquidos densidades muy dispares, lo que nos permite con una ligera modificación en sus proporciones obtener fácilmente las distintas densidades que nos servirán de patrón.

Preparamos una escala de densidades comprendida entre 1.001 y 1.040, con intervalos de 5 unidades, pudiendo valerlos para ello de dos procedimientos. El más práctico es hallar las densidades por tanteo, partiendo de una mezcla de densidad conocida e ir agregándole cloroformo o benzol, según queramos obtener otra densidad menor o mayor que la inicial. El otro procedimiento es más científico, pues se basa en la aplicación de una fórmula matemática algo complicada, pero al llevarlo a la práctica nos encontramos con que difícilmente obtenemos con exactitud la densidad deseada y, por tanto, debemos también recurrir, para solucionarlo, al tanteo.

Para medir la densidad no hay más que coger una gota de la orina con una pipeta y dejarla caer suavemente en el interior de un tubo de escala. Pueden ocurrir entonces tres cosas:

que quede flotando en la superficie, que vaya al fondo o bien que quede en una posición intermedia. En este último caso el problema está ya resuelto y la densidad nos viene dada por la de la mezcla. Si la gota se ha ido al fondo, hay que hacer la prueba con mezclas de mayor densidad, y por el contrario si queda flotando en la superficie (prueba de que es menos densa que la mezcla), lo haremos con otras de densidad menor. En el caso en que nos encontremos que en dos tubos sucesivos de la escala (cosa tanto más improbable cuanto mayor sea el número de tubos de la mezcla de que dispongamos) la gota es demasiado ligera para uno y excesivamente pesada para el otro, la densidad naturalmente será la intermedia entre estos dos valores, y si queremos precisar más, no nos queda más solución que preparar mezclas intermedias para poderlas enfrentar con el líquido problema, aunque en realidad el error que pudiera existir es muy pequeño, dado que pequeño es también el intervalo entre las distintas densidades de la escala.

Y para terminar diremos que hay que tener en cuenta que el cloroformo y el benzol estén bien mezclados, realizando una vigilancia rigurosa de las muestras, pues la diferente facilidad de evaporación de uno y otro cuerpo hace que varíen las densidades en escaso tiempo. Se tendrá también en cuenta que la gota no se adhiera a la pared del tubo que la recibe al realizar la determinación, y finalmente, que cuando en una mezcla se han realizado ya varias determinaciones, conviene separar las gotas de orina que han quedado en el interior del frasco, pues alteran su densidad, consiguiéndose esto fácilmente por filtrado a través de algodón.

Para lograr una mayor seguridad en estos resultados, comprobamos frecuentemente los diferentes tubos de las escalas mediante pequeños densímetros y además enfrentándolos con orina de densidades conocidas.

Conclusión

De las numerosas pruebas realizadas en personas sanas hemos llegado a la conclusión de que con esta técnica, un tiempo de diuresis superior a 100 minutos, indica la existencia de un poder antidiurético, patológicamente aumentado en el líquido problema. Un tiempo de diuresis inferior a 50, indica la existencia de un poder diurético del líquido empleado.

Summary

The antidiuretic power of urine and of organic humours is being measured according to the following technique :

1) 150 c.c. of the problem liquid are collected to which are added 5 c.c. of merthiolate sodium at 1/1.000 and 2 c.c. of acetic acid. This liquid is placed in a dialyzator, the bottom of which has been previously closed up with a celophan membrane, and both are placed into a crystallizing vessel containing distilled water (which is changed at half-time of the test). The stove and ventilator are set in motion and are conveniently placed so that the current air of the latter is heated by the former to some 20°C.

At the same time the food is withdrawn from the two groups of four rats each, chosen for the experiment.

2) Ten hours after the mentioned preparations have been initiated, hydration of the rats is proceeded with by means of a gastric injection of water in a quantity of 2,5 % of their weight.

3) Two hours after the former operation, the dialysis-concentration being terminated, the intraperitoneal injection of the prepared problem-liquid is proceeded with, same being distributed exactly among the eight rats experimented upon.

Definitive hydratation follows in a quantity corresponding to 5 % of their weight.

The rats are placed in two groups of four animals each in a corresponding cage, their diuresis being measured every 15 minutes, after rejection of the first determination.

4) The result in «time of diuresis» is noted, viz: the time of the test necessary for the rats to eliminate a quantity of urine equivalent to 2,5 % of their weight.

5) Means of security: a) Observation of diuresis in the rats in the interval between the first and the second hydration. b) Measurement of the density in doubtful cases.

We shall expose the results obtained expressed in «time of diuresis» in the multiple experiments realized with our technique in standard tests in order to precise the times of normal diuresis:

Standard Test:

- 1) Ingestion of water by the digestive way.
Times of diuresis comprised between 50 and 70 minutes.
- 2) Water by the digestive way, plus intraperitoneal injection of 2 c.c. water and.
- 3) Water by the digestive way, plus intraperitoneal injection of 2 c.c. of physiological serum.
Time of diuresis comprised between 65 and 85 minutes.
- 4) Water by the digestive way, plus intraperitoneal injection of dialyzed and concentrated urine of a normal individual.
Times of diuresis comprised between 70 and 100 minutes.
- 5) Water by the digestive way plus hypophysine by the intraperitoneal way.
 - a) less than 1/100 unities Voëgtin per rat,
Time of diuresis less than 100 minutes,
 - b) more than 1/100 unities Voëgtin per rat,
Time of diuresis «almost always» more than 100 minutes.

Time roughly proportional to the quantity of hypophysine injected: With quantities only slightly surpassing the number of 1/100

U.V. per rat, the time of diuresis has been on some occasions slightly inferior to 100 minutes.

The authors conclude that a time of diuresis superior to 100 minutes indicates a pathologically increased antidiuretic power in the test liquid, whilst a time of diuresis inferior to 50 minutes indicates a diuretic power of the said test liquid.

Bibliografía

- (1) BURN, BIJLSMA y GADDUM : *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* X, 943. 1928.
- (2) BURN, J. H. : *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* IV, 517. 1931.
- (3) DALE, H. H. y LAIDLAW, P. P. : *J. Pharmacol. exc. Therap.* 4, 75-95. 1912.
- (4) GIBBS : *J. Pharm.* 40, 129-34. 1930.
- (5) GILMAN, A. y GOODMAN, L. : *J. Physiol.* 90, 113,23. 1937.
- (6) GILMAN, A. y GOODMAN, L. : *Bases Farmacológicas de la terapéutica*. Cap. XXV. Barcelona 1935.
- (7) KRIEGER, V. I. y KILVINGTON, T. B. : *Med. J. of Australia*, 1, 575-85. 1940.
- (8) KRIEGER, V. I. y KILVINGTON, T. B. : *J. of Med. End.* 435, IV. 1946.
- (9) ROBINSON, H. y FARR, E. : *Ann. Inter. Med.* 141, 42-54. 1940.
- (10) AMAT : *Comunicación verbal*.

