

**Efectos de
esteroides en el
metabolismo
del agua y los
electrolitos en el
embrión de pollo**

**HUMBERTO RIVIELLO
QUINTANA***

LA INTRODUCCIÓN de la metodología científica en la bioquímica contemporánea ha producido considerables avances en el conocimiento de numerosos compuestos con actividad hormonal. Las hormonas corticosuprarrenales son un ejemplo claro sobre este tema.

A cada demostración de la acción biológica o terapéutica para una determinada estructura le siguió una extraordinaria actividad para producir estos compuestos en escala industrial y hacerlos asequibles para su empleo. El problema se consideró bajo dos aspectos: primero, por una parte en el terreno de la investigación obtener mejores y más potentes esteroides de síntesis con el menor número de efectos colaterales indeseables; segundo, llevar al plano de la producción industrial estos compuestos, de tal suerte que fuese posible satisfacer su demanda, cada día creciente, por la profesión médica.

Así fué como la febril actividad de estos últimos diez años ha dado lugar a un gran número de ingeniosas técnicas que han hecho posible el internarse cada vez más en la estructura interna de la molécula de los corticoesteroides. La modificación, distorsión y substitución de átomos o grupos atómicos sobre un esqueleto carbonado común, dió lugar a los más diversos edificios químicos con respuestas farmacológicas en ocasiones no relacionadas entre sí.

Los esfuerzos de los químicos y farmacólogos estuvieron centrados en un principio en la producción de aquellas hormonas naturales, aisladas y caracterizadas ya por Kendall y Reichstein, en el período comprendido de 1936 a 1937¹.

La síntesis parcial de la cortisona fué comunicada por Sarett en 1946 a partir de la bilis de buey². Pero no fué sino hasta el reporte de

* Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de México.

Hench y col. en 1949 señalando que la cortisona y el ACTH producían notable mejoría en los pacientes tratados de artritis reumatoide, que se enfocó la atención de la profesión médica sobre los efectos de esta droga en un grupo considerable de enfermedades, en ocasiones sin relación alguna entre sí, de tal manera que en algunos casos ha existido dificultad para la evaluación clínica de estos esteroides.³

Casi a continuación de la síntesis de la cortisona se reportó la síntesis de la hidrocortisona. Quedó de esta manera demostrada las posibilidades de la química orgánica de síntesis, se había logrado fabricar sustancias que el organismo producía.

Sin embargo, durante los años que siguieron a este descubrimiento, han aparecido numerosas comunicaciones en la literatura que señalan la presencia de efectos colaterales indeseables de estas sustancias^{3, 4}. La mayoría de los efectos colaterales indeseables observados en la clínica tales como excesiva retención de sodio, excreción de potasio, cara de luna, balance nitrogenado negativo, osteoporosis, reactivación o perforación de úlceras pépticas, aumento en el requerimiento de insulina en el diabético, enmascaramiento de los signos y síntomas usuales de la infección y psicosis no son sino manifestaciones exageradas de las funciones metabólicas normales de estas sustancias.^{3, 5} El siguiente paso que se intentó fué el tratar de obtener principios activos que el organismo producía, no únicamente con mayor actividad sino con menor grado de efectos colaterales no deseados. Ciertamente, existía un precedente poco afortunado con las vitaminas, las que se obtuvieron por vía sintética, pero muchos intentos de modificar su estructura dieron lugar a destrucción de su potencia y en ciertos casos a derivados antivitaminicos⁵.

Antes de desarrollar el tema de los nuevos glucocorticoides de síntesis y en particular de la 9 alfa-fluoro 16 alfa hidroxí delta, hidrocortisona (triamcinolona), conviene señalar la constitución primaria de los mismos.

El edificio molecular de los adrenocorticoides se halla levantado sobre el esqueleto estructural de un hidrocarburo policíclico formado por tres ciclos hexagonales y un ciclo pentagonal que presentan lados comunes.

Las hormonas adrenocorticales derivan del hidrocarburo tipo pregnano, mejor dicho de su derivación etilénico delta⁴ pregneno.

La desinencia "eno" indica no saturación, lo mismo que la letra griega delta, la cual es utilizada para ubicar la insaturación en una cadena o ciclo de un complejo orgánico. En lo que respecta al número exponen-

cial nos indica el sitio del enlace etilénico. En el esqueleto del delta pregneno (Figura 1) los anillos se denominan con las letras del alfabeto A, B, C, y D y en los carbonos la numeración respetando la nomenclatura química en sentido inverso a las manecillas del reloj, salvo en los anillos B y C en los que la numeración se continúa sobre el carbono más próximo al último numerado. En una palabra, el pregnano estaría constituido por el núcleo del androstano dehidrogenado sobre el C4 y el C5 con una cadena lateral etilo sobre el C17.

La hormona adrenocortical más sencilla aislada por Kendall y Reichstein fué la dexoxicorticosterona que químicamente se designa como 3-20 diceto, 21-01-delta⁴ pregneno (Figura 1). Esta hormona posee acción evidente sobre el metabolismo hidrosalino pero carece de acción sobre el glucogénico.

El segundo compuesto en orden de complejidad fué la corticosterona, 3-20 diona, 11 Beta-21 diol delta⁴ pregneno, que se diferencia de la anterior por la presencia de una función oxigenada en C11 (hidroxilo alcohólico) (Figura 1). Esta sustancia muestra actividad glucocorticoide, y actividad mineralocorticoide relativamente menor, deduciéndose de este hecho la importancia que posee la función oxigenada sobre el C11 en el metabolismo hidrocarbonado.

Finalmente observamos en la hidrocortisona un hidroxilo alcohólico en C17 en posición alfa (Figura 1). Los estudios farmacológicos mostraron que en esta función (OH en C17) carece de por sí de actividad glucocorticoide; pero en cambio, actúa reforzando o potenciando la que corresponde al C11 (Acción de la función oxigenada o alcohólica). También se comprueba que posee una acción antagónica sobre el metabolismo electrolítico, o sea, que disminuye la capacidad de retener agua y sal, que caracteriza la desoxicorticosterona, como ocurre con la 17 alfa hidroxicorticosterona, otra de las hormonas aisladas por Kendall y que carece de actividad mineralocorticoide. Hemos de hacer notar que las letras alfa y beta fueron adoptadas según la convención de Fiesser y Fiesser para designar las formas esteroisómeras de esteroides con respecto al grupo tomado como referencia; aclarando que el metilo C₁₀ y C₁₃ se encuentran por encima del plano determinado por el esteroide, es decir, saliendo del plano del papel. Si la orientación del oxhidrilo o de otro sustituyente corresponde al del metilo C₁₀, el átomo o el grupo posee la configuración beta y se representa por un trazo lleno. Inversamente, cuando un átomo o grupo de átomos se halla colocado por debajo del plano

general, (en posición trans - a través - con respecto al metilo angular) posee la configuración alfa y se representa por una línea punteada.

Parece estar fuera de duda que los adrenocorticoides con actividad biológica tienen todos ellos elementos básicos comunes: en el anillo A función cetónica en C₃ y doble enlace conjurado en C⁴, en el anillo D una cadena lateral alfa cetol de dos carbonos. Un oxígeno en C₁₁ es característico de los esteroides corticosuprarrenales y es esencial para la mayor parte de su actividad^{1, 6}.

De los análisis de sangre venosa de las cápsulas suprarrenales de varias especies de animales se han encontrado, aplicando técnicas de cromatografía en papel para su separación, tres esteroides principalmente: la hidrocortisona, la corticosterona y la aldosterona. La producción de las dos primeras varía ampliamente; sin embargo, en el hombre y en el perro, la hidrocortisona predomina, mientras el principal compuesto en la rata y en algunas otras especies es la corticosterona. Se ha demostrado que también algunos otros esteroides se secretan en pequeñas cantidades.

En vista de los conceptos actuales sobre la biosíntesis de los corticosteroides, algunos de estos compuestos se consideran como intermedios en el metabolismo normal de la hidrocortisona, la corticosterona y la aldosterona. Pero es posible que bajo circunstancias no definidas con precisión, un compuesto que normalmente sólo sea una etapa en la cadena metabólica, puede aparecer como un componente primario en la sangre venosa de las cápsulas suprarrenales⁷.

Los esteroides de actividad cortical se sintetizan a partir de moléculas sencillas como el acetato, o de moléculas más complejas como el colesterol (esquema). Hay sin embargo, evidencias que sugieren que una parte de la esteroidogénesis puede realizarse, sin la formación de colesterol como intermediario, aunque, este es el precursor más eficiente en la formación aguda de hormonas^{6, 7}.

El paso final en la formación de la hidrocortisona y en corticosterona, se realiza por la introducción de un grupo 11 beta oxhidrilo en presencia de la 11 beta hidroxilasa. Esta enzima está en la fracción mitocondrial del tejido suprarrenal; requiere para su actividad TPNH y oxígeno⁷. La aldosterona (figura 1) que presenta un grupo aldehído en C₁₈ es posible que derive de la corticosterona⁶.

Una vez ubicados los grupos químicos con actividad farmacológica específica sobre el esqueleto hidrocarbonado, y veremos cómo estos conocimientos han influido en la investigación de los nuevos corticosteroides de síntesis.

En 1953 Fried y Sabo⁸ reportaron que la introducción de un átomo de fluor en la posición 9 alfa de la hidrocortisona; proceso llamado halogenación⁸, resultaba en un aumento de su poder antiinflamatorio en siete veces, el de la hidrocortisona⁹, en 10 veces su poder antiartrítico¹⁰ y en 13 su efecto glucogenético¹¹. Desafortunadamente, su propiedad de retener agua y sal se incrementó en cerca de cincuenta veces más que el que corresponde a la hidrocortisona¹². Como consecuencia de este hallazgo, se pensó que el aumento de la actividad anti-inflamatoria y anti-reumática se hallaba relacionado con el volumen atómico del halógeno considerado. Siendo así, se estableció que la actividad del esteroide se encontraba en razón inversa del volumen del átomo del halógeno unido a C₉.

Se comprobó que mientras el átomo de bromo, cuyo volumen atómico es de 2.28 A origina la 9 alfa bromohidrocortisona con potencia correspondiente a la mitad de la asignada a la hidrocortisona, el correspondiente fluora derivado, en el que el volumen del átomo de fluor es de 1.28 A, representa diez veces más su actividad.

Hay sin embargo, hechos en contra de esta hipótesis; la sustitución del hidrógeno por un oxhidrilo, el cual es similar en dimensión al fluor, tiene como consecuencia la reducción de su actividad en cerca de cincuenta veces. Lo mismo pasa cuando se sustituye por un grupo metoxilo cuyo volumen atómico se encuentra entre el cloro y el bromo.

Estos hallazgos parecen estar a favor del punto de vista que es la electronegatividad del sustituyente y no su volumen atómico el que determina la mayor actividad de los 9 alfa halogenados⁵. La electronegatividad de un elemento es su capacidad para quitar electrones de los elementos próximos. Sin embargo, aunque este derivado halogenado⁹ (alfa-fluoro-hidrocortisona) no fué adecuado como antirreumático por su gran actividad mineralocorticoide, se había ya previsto la posibilidad de obtener por modificaciones graduales de la estructura molecular nuevos derivados más potentes, a la vez que con menos efectos colaterales indeseables.

No obstante lo mencionado con anterioridad, su empleo, en entidades dermatológicas, en casos de enfermedad de Addison y en adrenalectomías representó un notable adelanto terapéutico¹².

En 1955 Bunin¹³ reportó los delta¹ análogos de la cortisona y la hidrocortisona, llamados prednisona y prednisolona respectivamente (figura 2). La introducción de una doble ligadura entre los carbonos 1 y 2 resultaba particularmente ventajosa porque estos compuestos causaban menor retención de agua y sal que la cortisona y la hidrocortisona. Sien-

do sin embargo, efectivos como antiinflamatorios en un quinto de las dosis útiles de la cortisona. Como resultado de una serie de investigaciones, se demostró un hecho fundamental: en el organismo las moléculas del esteroides sufren varias reacciones, principalmente reducciones, dislocaciones y ruptura de cadenas; como consecuencia de ésto, los compuestos dotados de actividad antiinflamatoria son también reducidos y parciadamente destruídos. Aunque muchos investigadores creen que los esteroides actúan como catalizadores, iniciando o desencadenando algunas reacciones y luego regulando su intensidad, sin tomar ellos mismos parte en el mecanismo de esta serie de transformaciones biológicas, es indudable que estos catalizadores no permanecen inmunes, es decir que también ellos sufren transformaciones en la estructura molecular, reducción, acortamiento de cadenas, etc.¹⁴.

Desde un principio llamó la atención la aparente inercia química que presentaba el oxhidrilo en el C₁₁, que fué explicada en razón del impedimento espacial que provoca la presencia de los metilos sobre C₁₀ y C₁₃. Este oxhidrilo alcohólico se muestra remiso en reaccionar frente a distintos reactivos químicos; así por ejemplo, no es acetilable ni es oxidable con facilidad en presencia de los oxidantes comunes.

Cuando se analiza la fórmula de un esteroide con actividad fisiológica, por ejemplo la prednisolona, (figura 2), cuyas funciones químicas a que debe su actividad se encuentran sobre los anillos A, C y D, se ve que solo en lo que toca al anillo C, posee protección suficiente frente a los distintos agentes químicos o biológicos que pueden ocasionalmente destruir su actividad. Por consiguiente aquellos centros de actividad en el anillo A carecen de protección y son fácilmente reducidos y por lo tanto, modificados en su estructura química y en su actividad fisiológica. De esta manera se trató de introducir grupos químicos (radicales) que constituyeran verdaderas defensas contra la acción de los reactivos químicos capaces de alterar la integridad molecular de estos compuestos en aquellos puntos fácilmente atacables.

Con esta idea, en 1955, Hogg y cols.⁵ reportaron los primeros derivados metilados con actividad biológica (fig. 2). La metilación en la posición dos-alfa causó un aumento considerable, de seis veces más en la actividad glucomeogénica de la hidrocortisona, y solo 4.5 en su actividad antiinflamatoria en la rata. Pero por otra parte en el hombre y en el perro no se observó aumento significativo de la actividad gluconeogénica.

En todos los esteroides 11 beta hidroxilados la 2 alfa metilación causó gran aumento de su actividad mineralocorticoide en la rata (Byrnes y col. 1956⁵, en el hombre y en el perro (Liddle y col. 1956⁵.

Sin embargo, el paso del grupo metilo de la posición 2 alfa a la posición 6 alfa logró suprimir de una manera importante el potente efecto mineralocorticoide de los 2 alfa metil derivados y en pequeña escala esto representó una ventaja sobre la prednisolona.

Los seis alfa metil corticoides fueron sintetizados por Spero y col. en 1956 y 1957⁵ y sus efectos clínicos fueron reportados por Boland y Liddle en el 9º Congreso Internacional de Reumatología en Toronto en 1957¹³. La 6 alfa metilprednisolona mostró efectos sensiblemente semejantes a la prednisolona en el hombre, tanto en su actividad glucocorticoide como antiartrítica, pero menor efecto mineralocorticoide. En la rata estos dos efectos estuvieron aumentados al triple y al doble respectivamente y permitió la excreción de sodio y agua en animales con sobrecarga de agua y sal⁵.

Es indudable que la posición próxima para colocar el radical metilo protector de la función cetona sobre C₃, hubiese sido en el C₄; pero en realidad esto no es posible hacerlo sin afectar el doble enlace entre los carbonos C₄ y C₅ que constituyen uno de los centros de actividad biológica de los corticoesteroides. A partir de estos ensayos se abandonaron los procesos de metilación sobre esta parte de la molécula y la búsqueda de nuevas drogas se orientó en el sentido de modificar el otro extremo del esteroide (anillo D).

En 1953 Hirschman y col. publicaron que la adición de un grupo oxhidrilo en posición 16 alfa a la desoxicosterona (Doca) suprimía el característico poder de retención de sodio de esta substancia¹³.

Tres años más tarde Bernstein y col.¹⁵ reportaron que el característico poder de retención de los 9-alfa fluoroesteroides, era suprimido por la adición del grupo oxhidrilo 16 alfa, sin pérdida de la gran actividad glucocorticoide de estos compuestos.

La adición del grupo oxhidrilo 16 alfa no sólo no produjo retención de sodio sino que por lo contrario, mostró un efecto natriurético^{15, 16, 17}. Es a esta particular virtud a la que debe la 9 alfa fluoro-16 alfa hidroxidelta 1 hidrocortisona (triamcinolona) (Figura 2), su amplia y rápida difusión en el campo de la terapéutica médica¹⁸.

Su actividad glucocorticoide medida por el depósito de glucógeno hepático en ratas machos, inmaduros, adrenalectomizados y en ayunas, es de tres a doce veces mayor que el que corresponde a la prednisolona y

18 a 36 veces superior al de la hidrocortisona¹⁹. Su poder antiinflamatorio medido por la inhibición en la formación de granulomas alrededor de pellets de asbesto insertados subcutáneamente por la misma incisión de la adrenalectomía, se encontró igual al de la prednisolona y diez veces superior a la hidrocortisona.¹⁹

La acción más interesante de esta droga es la marcada diuresis y excreción de sodio en ratas adrenalectomizadas con sobrecarga de agua y sal. Así como también en ratas y perros normales¹⁹.

En los enfermos bajo medicación no hay retención de sodio según Hellman y col.¹⁷, lo cual se ha confirmado por numerosos investigadores^{18, 20}.

En experimentos con animales no hay excreción anormal de potasio y tampoco se encontró en experiencias humanas, usada a dosis terapéuticas^{16, 17, 18, 19, 20}.

En exámenes cuidadosamente realizados por Mac Gavack y col.²¹ en enfermos con edema, se observó una pérdida grande de sodio y agua.

El balance nitrogenado y el del calcio no sufre cambios significativos a dosis terapéuticas, pero sí cuando se da a dosis elevadas¹⁶.

Los efectos metabólicos de la triamcinolona, la prednisona y la 6 alfa metil-prednisolona sobre la prueba de tolerancia a la glucosa y la excreción de uropepsina se han estudiado por Kupperman y col.²² quienes encontraron del 15 al 20 por ciento sobre el valor basal de la glucosa sanguínea al cabo de dos horas, previa administración durante cinco días de triamcinolona, 6 metil prednisolona y prednisona a la dosis de 32, 32 y 40 miligramos respectivamente. En lo referente a la excreción de uropepsina no encontraron diferencia aunque con la 6 metil prednisolona, fué ligeramente inferior.

Los mismos autores estudiaron el efecto de dichos corcoesteroides sobre la secreción de ACTH en sujetos normales y con hiperplasia adrenocortical. La capacidad del esteroide para inhibir la secreción de ACTH fué valorada en razón de su habilidad para disminuir la secreción de 17 cetosteroides y 17 hidroxisteroides. La triamcinolona demostró ser un inhibidor efectivo, mientras que la 6 alfa metil prednisolona, en dosis comparables, no parece deprimir la excreción de 17 cetosteroides, a un nivel tan bajo como la triamcinolona. La excreción de 17 hidroxisteroides fué igual que con la triamcinolona. Cuando los niveles de 17 hidroxisteroides se estudiaron en pacientes bajo tratamiento con prednisona se encontró un aumento en su secreción, aún cuando la excreción de 17 cetoesteroides se suprimió²².

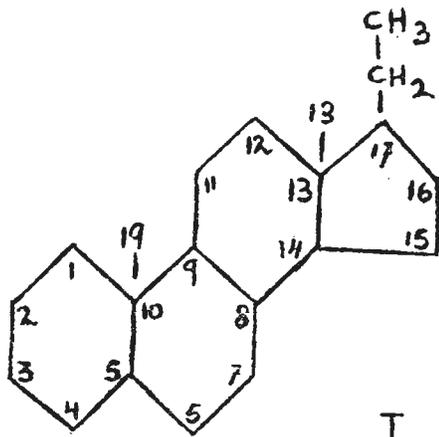
Es indudable que la investigación de las características bioquímicas y farmacológicas de los esteroides con actividad glucocorticoide, estudiadas en diversos animales experimentales y no sólo en el hombre, es importante para definir sus aplicaciones terapéuticas. Entre los sujetos de experimentación que más se han utilizado para el estudio de los glucocorticoides están la rata, el ratón y el perro. Sin embargo, existen otros que resultan adecuados en algunos aspectos, entre ellos el embrión de pollo tiene la ventaja de su sensibilidad a la acción de estas drogas, teniendo además una rápida respuesta, algunas veces en 24 horas^{24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32}. Por lo que se consideró interesante utilizarlo como sujeto experimental.

El embrión de pollo se ha utilizado ampliamente en los laboratorios de investigación biológica y médica para el cultivo de virus, rickettsias y muchas otras clases de microorganismos²³. Fue introducido como sujeto experimental en la investigación de hormonas corticosuprarrenales por Landauer y col. en 1947.²⁴, quienes señalaron el efecto inhibitor en su desarrollo por un extracto de corteza suprarrenal.

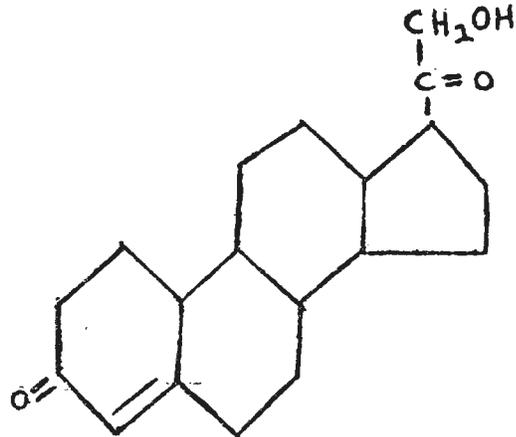
Han aparecido numerosas publicaciones acerca de la influencia de la cortisona en el metabolismo del embrión de pollo^{25, 26, 27, 28, 29, 30, 31} las que indican, en general, que es posible reproducir en él los efectos fundamentales que se atribuyen a esta sustancia en mamíferos, lo que hace considerarlo un buen sujeto para experimentación con otros glucocorticoides. Por otra parte, el embrión de pollo constituye un sistema cerrado en el que se pueden eliminar con bastante certeza las influencias del medio externo. Sus productos de excreción pueden ser valorados con bastante exactitud. Su utilidad estadística es indudable ya que su fácil manejo permite el estudio de un gran número de sujetos al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones experimentales; sin embargo, se debe aceptar que todavía existen demasiados puntos oscuros, acerca de su bioquímica y de su fisiología.

El objeto de este trabajo es, tomando como punto de comparación la cortisona, valorar el efecto de la triamcinolona sobre el metabolismo de los electrólitos y el agua, dado que numerosos datos de la literatura han sostenido esta sustancia no sólo no retiene agua y sal sino inclusive posee un efecto natriurético, así como una mayor actividad glucocorticoide.

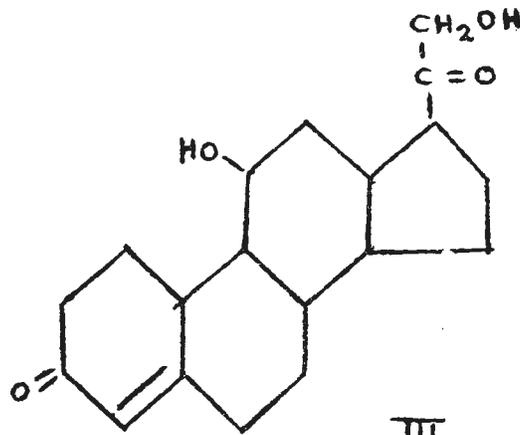
FIGURA 1



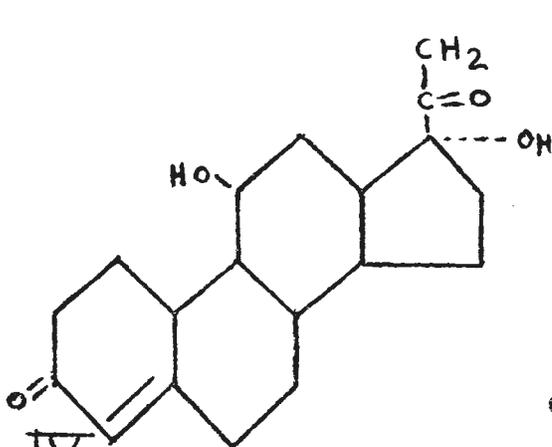
I



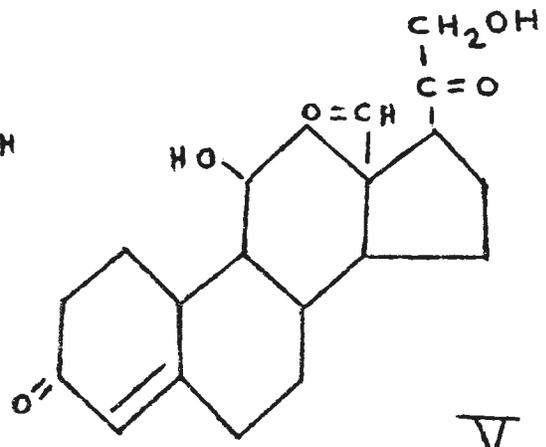
II



III



IV

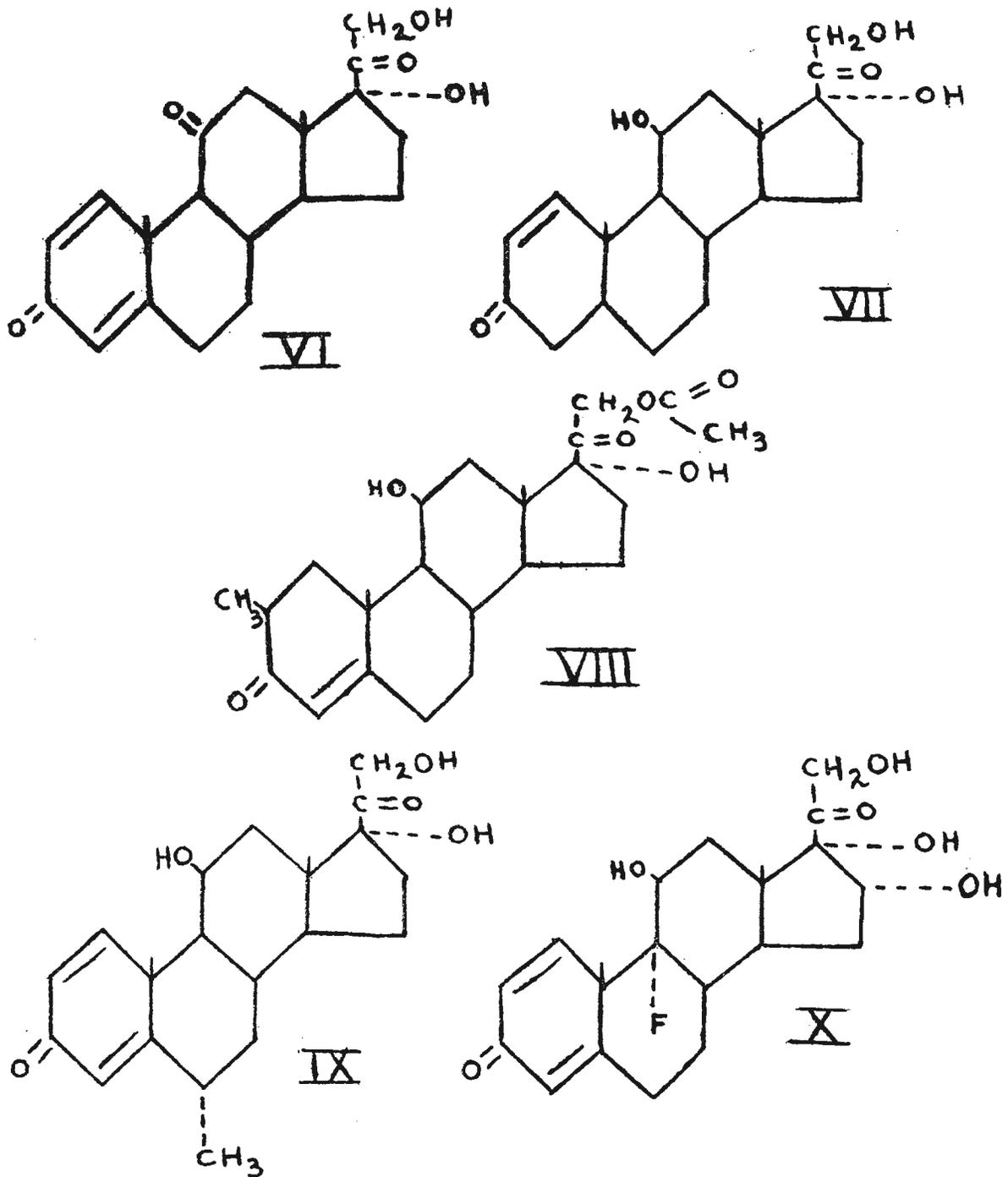


V

I Δ^4 pregneno
 II Desoxicorticosterona
 III Corticosterona

IV Hidrocortisona
 V Aldosterona

FIGURA 2



VI Prednisona

VII Prednisolona

VIII Acetato de 2 alfa metil hidrocortisona

IX 6 alfa metil prednisolona (Medrol)

X Triamcinolona

MATERIAL Y METODO

Para todos los experimentos se emplearon huevos embrionados Leghorn, con 10 días de incubación. El esteroide administrado se inyectó por vía corio-alantoidea, de acuerdo con una modificación a la técnica de Beveridge y Burnet³³, suspendido en 0.1 ml. o 0.2 ml. de solución estéril de NaCl al 0.85 por ciento; como testigos se emplearon huevos inyectados con la solución de NaCl en las mismas condiciones. Los huevos se colocaron en una incubadora a 37° C. después de la inyección. Transcurrido el lapso fijado, se procedió a obtener los líquidos amniótico y alantoideo, en los que se determinaron los niveles de sodio y potasio por flamometría, empleando el espectro fotómetro de Coleman, Modelo B.

La técnica de inyección del huevo embrionado fué la siguiente: Por transiluminación se marcó un punto en la cámara de aire y otro en una zona avascular: a continuación se hizo la asepsia de la región con solución de yodo al 3.5 por ciento. Utilizando un punzón previamente flameado, se hicieron los orificios correspondientes a los puntos marcados, cuidando de no herir la membrana corioalantoidea; se inyectó con una jeringa estéril la sustancia en estudio. Una vez inyectado el líquido se cubrieron los orificios con parafina y se continuó la incubación a 37° C. por períodos de tiempo variable de 24 a 96 horas, evitando que los huevos embrionados se movieran durante el tiempo de observación.

Las sustancias inyectadas fueron: triamcinolona, a la dosis de un microgramo por huevo, suspendida en 0.1 ml. de solución salina, o acetato de cortisona a la dosis de un miligramo por huevo, empleando en este caso 0.2 ml. de la solución salina.

Cumplido el tiempo fijado para hacer la determinación se procedió como sigue: con la ayuda de una tijera se quitó la cáscara que cubre la cámara de aire, después con una jeringa de 2 c. c. y provista de una aguja hipodérmica del número 22, se puncionó la membrana corioalantoidea, cuidando de no lesionar los vasos sanguíneos; se procuró extraer el líquido alantoideo casi en su totalidad, y el sobrante se secó con una toalla sanitaria de papel. Se procedió a extraer el líquido amniótico por punción a través de la membrana del mismo nombre.

El líquido alantoideo se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos.

Se tomó una alícuota de un líquido alantoideo o amniótico, según el caso, reuniéndose los mismos volúmenes de los líquidos de tres embriones que se guardaron en el refrigerador a 5° C. hasta su determinación.

Se prepararon los reactivos de trabajo de acuerdo con ³⁴. La valoración estadística se hizo por medio de las fórmulas habituales³⁵. Las diferencias entre promedios se consideraron con significado estadístico para valores de P «0.01.

RESULTADOS

En los animales tratados con triamcinolona la concentración del ión sodio en el líquido alantoideo se encontró más baja que en los testigos (Cuadro 1). Por otra parte el nivel de potasio se observó más alto.

En el líquido amniótico los cambios en el contenido de sodio no fueron significativos y la cantidad de potasio en los animales tratados con triamcinolona fué significativamente más baja que en los controles (Cuadro 1).

Cuando los niveles de los cationes estudiados se determinaron en los animales tratados con cortisona, se observó una baja en la cantidad del ión sodio con elevación de potasio en el líquido alantoideo a las primeras 24 horas (Cuadro 2, gráficas 1 y 2).

CUADRO 1

Niveles de sodio y potasio en los líquidos alantoideo y amniótico de embriones de pollo, después de 72 horas de inyectados con triamcinolona.

MICROGRAMOS INYECTADOS POR EMBRION

testigos 0.0

1.0

líquidos	*	mEq/L	*	mEq/L *	p
alantoideo sodio	14	120.4 ±	11	59.6 ± 7.7	0.001 ***
alantoideo potasio	11	2.5 ±	7	13.0 ± 1.3	0.001 ***
amniótico sodio	17	128.9 ±	12	132.5 ± 2.2	0.001 ***
amniótico potasio	17	5.2 ± .2	11	1.8 ± 0.6	0.25 ***

* Número de muestras. Cada muestra fué una mezcla del líquido de tres embriones.

** Desviación estandar.

*** Diferencia con los controles estadísticamente significativas. (Ver texto).

CUADRO 2

Niveles de sodio y potasio en los líquidos alantoideo y amniótico de los embriones de pollo, después de la inyección con cortisona.

mg. de cortisona inyectados por embrión

testigos 0.0

1.0

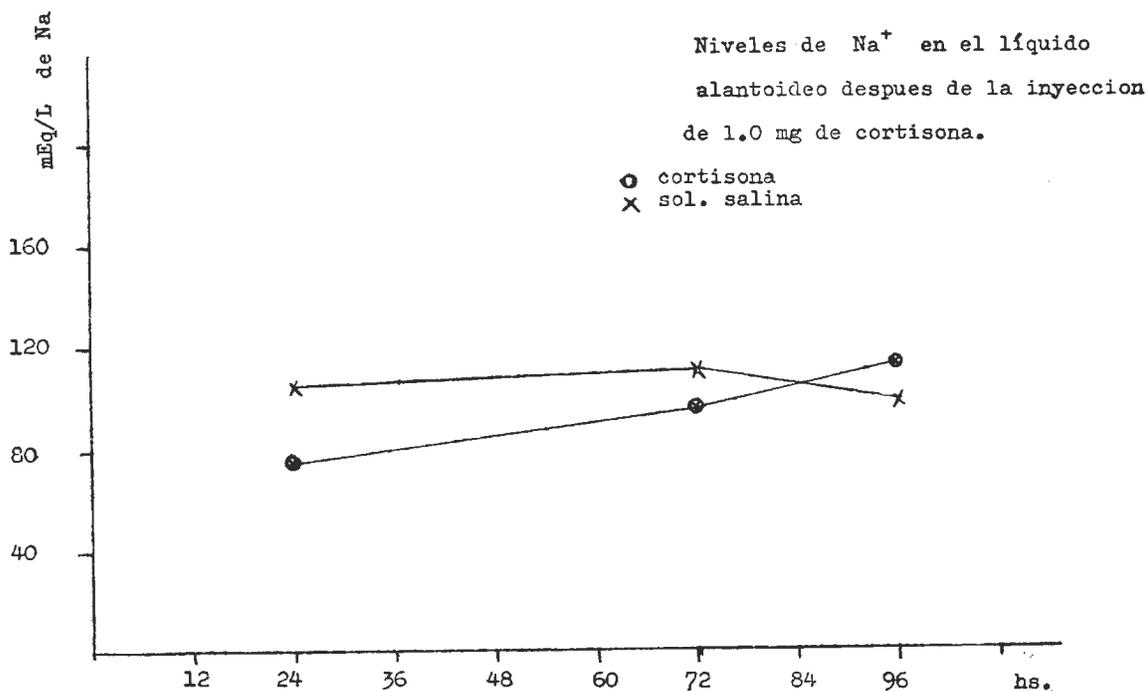
Líquidos	hs.	*	mEq/L	**	mEq/L	**	p
alantoideo sodio	24	3	100.6 ± 1.7	3	75.3 ±	5.2	0.001 ***
amniotico sodio	24	3	6.9 ± .02	3	8.4 ±	.7	0.25
alantoideo potasio.	24	3	126.6 ± .5	3	137.3 ±	6.9	0.01 ***
amniotico sodio	24	3	1.36 ± .07	3	3.5 ±	.1	0.60
amniotico potasio.	72	2	110.0 ± 18.0	12	95.5 ±	16.5	0.90
alantoideo potasio.	72	2	2.26 ± .02	5	9.6 ±	2.26	0.60
amniotico sodio	72	4	130.0 ± 18.	12	124.0 ±	23.0	0.01
amniotico potasio.	72	2	2.1 ± .08	12	2.36 ±	.08	0.30
alantoideo potasio.	96	4	99.5 ± .5	2	113. ±		0.001 ***
alantoideo sodio	96	2	5.25 ± .03	2	8.85 ± .4		0.001 ***
alantoideo potasio.	96	2	104.0 ± 6	2	147.0 ± 3		0.001 ***
amniotico sodio	96	2	8.35 ± .01	2	3.6 ± .01		0.001 ***

* Número de muestras. Cada muestra fué una mezcla del líquido de tres embriones.

** Desviación estandar.

*** Diferencias con los controles estadísticamente significativa (Ver texto).

GRAFICA 1



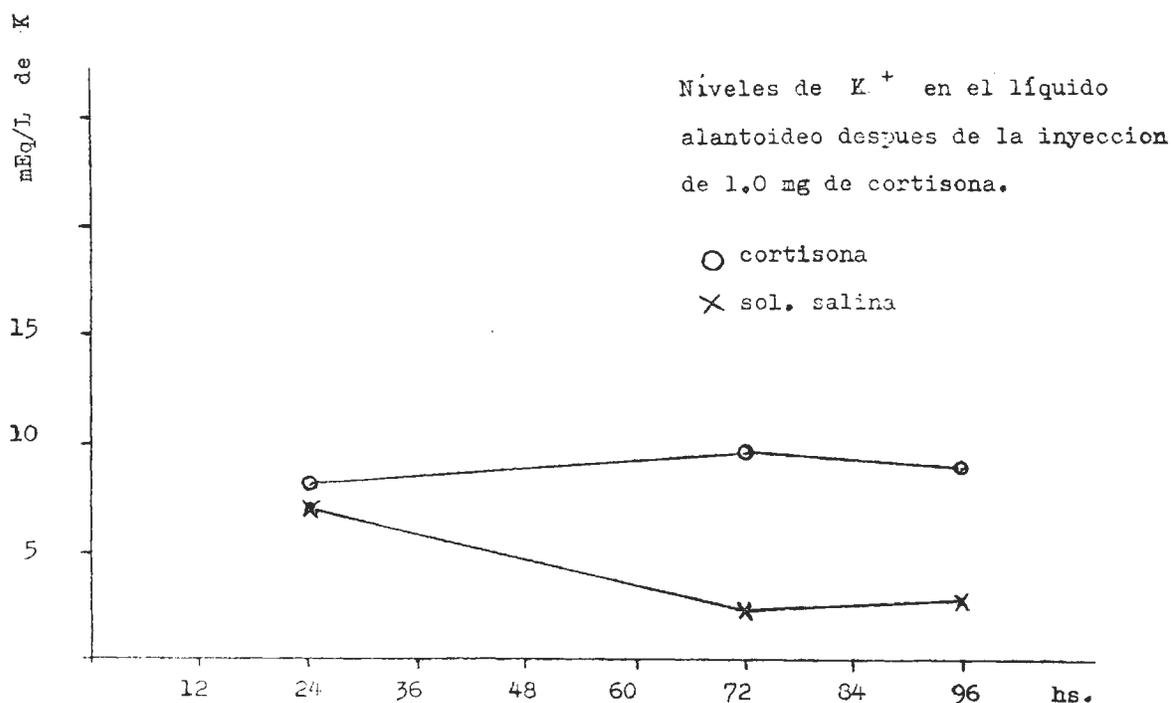
No parece haber una acción definida sobre el nivel de sodio en el líquido amniótico en los animales tratados con cortisona, comparados con los controles; aunque la elevación en su concentración significativa a las 24 y 96 horas, no se observó cambio significativo en este ión, en relación con los testigos a las 72 horas (Cuadro 2, Gráfica 3).

Los niveles en la concentración del ión potasio en el líquido amniótico pueden ser apreciados en el Cuadro 2 Gráfica 4. En este líquido, en apariencia, el hecho más sobresaliente es una disminución importante en la cantidad de potasio a las 96 horas, en los animales tratados con cortisona en relación a los controles.

DISCUSION

Si como se sabe el líquido alantoideo es semejante a la orina de los mamíferos^{27, 36}, desprende de los datos aquí reportados que la triamcinolona (esteroide sintético) produce retención de sodio y excreción anormal de potasio en el embrión de pollo. Con esta droga este efecto significativo no se esperaba ya que se ha sostenido que esta tiene una acción natriurética y ninguna sobre el ión potasio en el hombre, el perro, y en las ratas normales y adrenalectomizadas^{15, 16, 17, 18, 19, 21}. Es posible que esta controversia en los resultados esté relacionada con diferencias de es-

GRAFICA 2



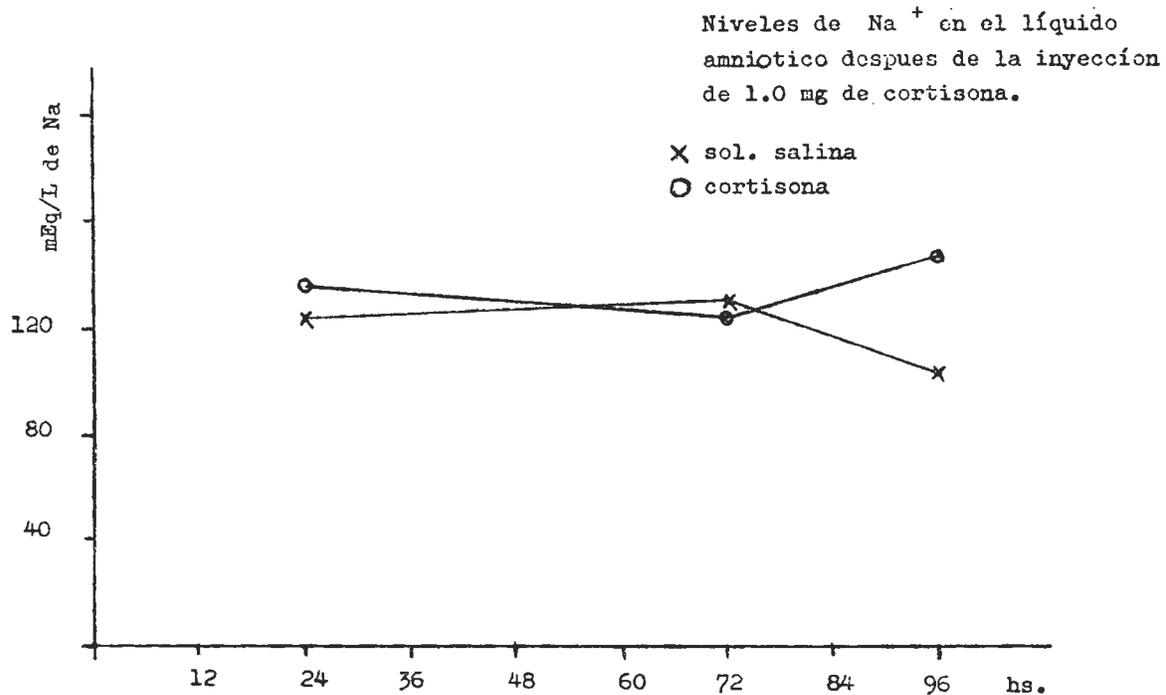
pecie y otros factores incompletamente estudiados, ya que en rigor la alantoides no funciona estrictamente a la manera del riñón de los mamíferos.

La cortisona en el presente estudio parece tener sobre el ión sodio una acción bifásica dentro de las primeras 96 horas después de la inyección. Con una primera fase de retención y una posterior de natriuresis. La resultante de este fenómeno no fué posible determinarla; por otra parte este efecto ya había sido notado por Kagawa y col.³⁷ en ratas adrenalectomizadas inyectadas con dosis de 0.5 y 1.0 mg. de cortisona.

En lo que se refiere al ión potasio se notó una eliminación anormal a las 72 y 96 horas, no obstante que a las 24 horas esta excreción no fué estadísticamente diferente de los controles ($p < 0.25$).

La excreción anormal de potasio producido por estas drogas en el presente estudio es posible que tenga relación con su actividad gluconeogénica y en consecuencia catabólica. Se sabe que la mayor parte del potasio intracelular se encuentra unido a las proteínas, ahora bien, el sodio es reabsorbido en los mamíferos a nivel tubular como catión de intercambio con el hidrógeno, el amonio y el potasio, y lo más probable es que penetre dentro de las células en substitución del potasio en un intento para mantener el equilibrio osmótico. Es evidente que la actividad

GRAFICA 3



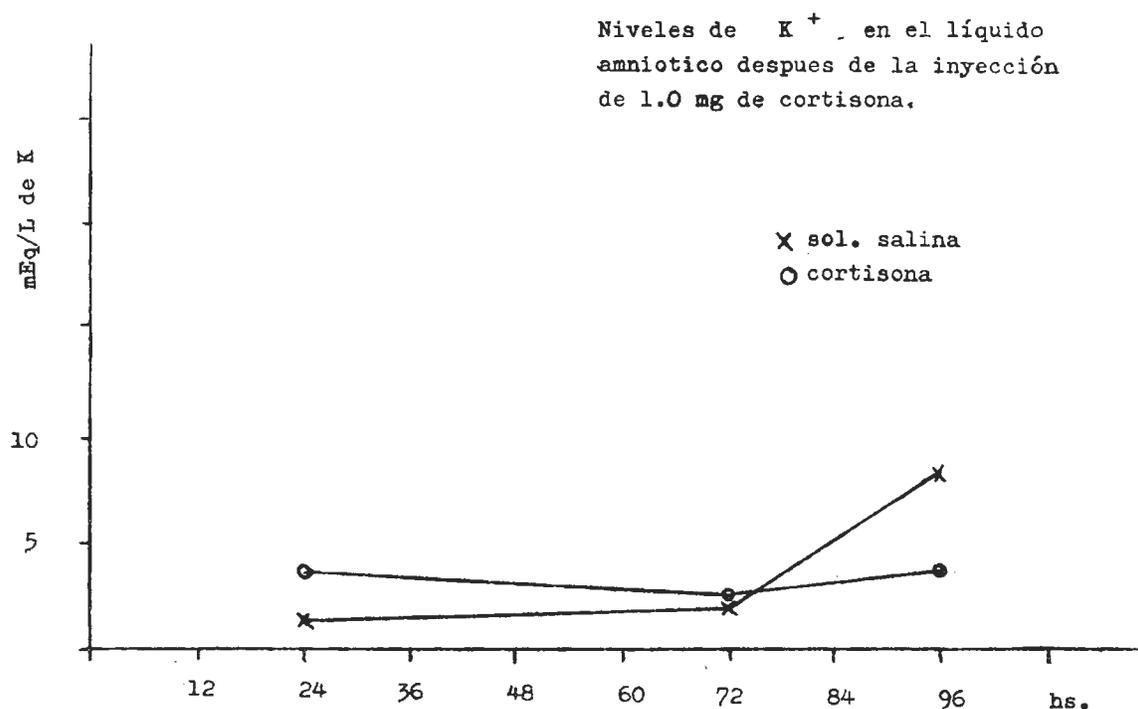
gluconeogénica está en juego, lo que está apoyado por la baja de peso, el aumento en la excreción del nitrógeno total y el ácido úrico con elevación del glucógeno hepático.

Danowski y col.²⁷ observaron en el líquido alantoideo de embriones de pollo tratados con cortisona a dosis variables de 0.25 a 4.0 mg., un aumento en la eliminación del ión sodio y disminución en la del potasio. Sin embargo estos investigadores trabajaron bajo situaciones experimentales diferentes.

Por otra parte, además de la conocida acción mineralocorticoide de la cortisona cuando se da a dosis elevadas y por grandes períodos de tiempo^{3, 4 y 38} se le ha encontrado efecto natriurético. Este hecho y algunos datos con él relacionados, serán examinados para tratar de aclarar el efecto natriurético de la 9 alfa-fluoro-16 alfa hidroxidelta 1 hidrocortisona en algunas especies, incluyendo al hombre y la posible relación que tenga con el embrión de pollo.

Davis y Howel demostraron que la cortisona o el ACTH producían natriuresis en perros normales o adrenalectomizados y con ascitis que se acompañaba de una elevación en la velocidad de filtración (VFG)⁴⁰ Garrod y colaboradores hallaron en perros adrenalectomizados a los que se les administró cortisona, una correlación clara entre

GRAFICA 4



VFG y la excreción de sodio, no obstante, indicaron que ésta retenía sodio a cualquier nivel de dosis pero que este efecto quedaba enmascarado por el aumento de la VFG⁴¹. Raíz demostró que en el hombre la inyección intravenosa de hidrocortisona eleva la VFG⁴². Levitt y col. hallaron en pacientes tratados con cortisona y alimentados con dieta hiposalina 27% de aumento en el espacio extracelular, con elevación del 25% en el nivel de sodio y 19% en el de cloro, dentro de los primeros diez días de tratamiento, aunque los valores volvieron a su valor basal a pesar de continuar el tratamiento. En estos pacientes la velocidad de filtración glomerular se incrementó progresivamente y el máximo se alcanzó cuando el balance de sodio se hizo negativo. No obstante que este experimento no revela el origen endógeno del agua, el sodio y el cloro, es posible que una fracción de sodio puede derivar del hueso que como se sabe lo contiene en cantidades apreciables. La sal presente en el intestino es otro origen potencial y las células de los tejidos pueden contribuir en alguna proporción⁴³. Así mismo, se sabe que la cortisona es capaz de normalizar la diuresis y llevar a valores normales los electólitos del plasma en pacientes con enfermedad de Addison e hipopituitarismos⁴⁴ y ⁴⁵. Kawalski observó en individuos bajo tratamiento de cortisona aumento en el espacio extracelular sin reducción en la excreción de sodio y cloro y elimina-

ción anormal de potasio, sin cambios en la osmolaridad o en la concentración de sodio y cloro en el suero⁴⁶.

Los resultados en ratas adrenalectomizadas en experimentos agudos con dosis de 0.5 y 1.0 mg. de los compuestos E y F revelan que éstos son capaces de retener sal como lo hacen en el hombre, sin embargo, el grado de retención parece ser débil y transitorio en comparación con una segunda fase excretoria³⁷. La excreción bifásica de sodio no sólo se ha visto en estos compuestos sino también con el alfa estriadol (Harrop⁴⁷ en perros alimentados con control de electrólitos³⁷. Roberts y col.⁴⁸ y Garrod⁴¹ han demostrado en perros adrenalectomizados cuando la cortisona y la D C A se dan juntas que, la reabsorción de sodio es completa a pesar del aumento en el VFG y sostienen que estos esteroides no tienen efecto opuesto sobre la excreción de sodio. Thorn⁴⁹ sin embargo reportó que la adición de 100 mg. de cortisona a pacientes que recibían 5 mg. diarios de DCA, daba lugar a un aumento en la excreción de sodio. Ross⁵⁰ ha demostrado en el hombre que la corticosterona o la hidrocortisona dadas simultáneamente con la aldosterona, deprimen la acción retencionista de sal de ésta última hormona.

Uete y col.⁵¹ han demostrado en ratas adrenalectomizadas, que el aumento en la dosis de cortisona o hidrocortisona antagoniza la acción retencionista de sal de la DOCA. El efecto de un microgramo de dl-aldosterona es abolido por 400 microgramos de hidrocortisona.

El mecanismo de acción de la cortisona es todavía desconocido, sin embargo, su efecto natriurético puede deberse a un predominio de la velocidad de filtración glomerular sobre su conocida acción de retener a nivel de los tubulos renales, ya que estudios previos han indicado que la cortisona y la hidrocortisona facilitan la excreción de sodio por aumento en la velocidad de la filtración glomerular ^{38, 39, 40, 41 y 46}. Obviamente, si esto es cierto, en el embrión de pollo es posible que se verifique esta condición.

En las ratas con edema nutricional su efecto diurético puede ser mejorado por elevación de la presión coloidosmótica del plasma a partir de las proteínas tisulares. La polifagia observada en estos animales puede contribuir en alguna forma elevando temporalmente las proteínas plasmáticas⁵².

La 9 alfa-fluoro-16 alfa hidroxidelta 1 hidrocortisona, también antagoniza la acción retencionista de la DOCA. Cinco microgramos de este esteroide inhiben la acción de 4 microgramos de DOCA.

De lo que se sabe, no es posible determinar el mecanismo de acción natriurético de la triamcinolona, el cual puede ser debido a una elevación en la velocidad de filtración en ratas adrenalectomizadas antagoniza la acción mineralocorticoide de la DOCA y la aldosterona y es posible que actúe por aumento de la velocidad de filtración glomerular o por una acción primaria sobre la reabsorción tubular de sodio⁵¹.

La presencia de un grupo C₁₆ oxhidrilo en este compuesto es interesante ya que ésta potencia la acción glucocorticoide de la hidrocortisona y de los delta-1 análogos de ella. Además suprime su actividad mineralocorticoide, así como también la de los potentes derivados fluorados a la hidrocortisona.

Compuestos con grupo C₁₆ oxhidrilo han sido aislados de la orina humana y para determinar su importancia biológica se hacen necesarios más estudios⁵³.

En el hombre empleada a dosis terapéuticas no retiene sal y no tiene ninguna¹⁸.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudió el efecto de la triamcinolona y la cortisona sobre los niveles de sodio y potasio en los líquidos alantoideo y amniótico de huevos embrionados Leghorn de 10 días de incubación. Las que se inyectaron por vía corioalantoidea a la dosis de un microgramo de triamcinolona suspendida en 0.1 ó 0.2 c. c. de solución salina 0.85 por ciento ó 1 mg. de cortisona suspendida en 0.2 c. c. de solución salina 0.85 por ciento por embrión.

La determinación de los cationes mencionados con anterioridad se hizo por flamometría, a período de tiempos variables de 24 a 96 horas.

Con la triamcinolona se encontró retención de sal y excreción anormal de potasio. Este no se esperaba ya que numerosas publicaciones aparecidas en la literatura han sostenido que posee acción natriurética y ninguna sobre el ión potasio en la rata, el perro y el hombre^{15, 16, 17, 18, 19, 20, 21}.

La cortisona en el presente estudio aparentemente ejerce una acción bifásica sobre la excreción de sodio. Con una fase inicial de retención dentro de las primeras 24 horas y una posterior de natriuresis. La resultante de este fenómeno se desconoce. Este hecho había sido notado por Kagawa y col³⁷ en ratas adrenalectomizadas, tratadas con dosis de cor-

tisona de 0.5 y 1.0 mg; esta misma sustancia dió lugar a excreción anormal de potasio durante el período de estudio.

La acción natiurética de la cortisona ha sido señalada por numerosos investigadores en la rata, perro, y el hombre y es probable que se deba a un aumento en la velocidad de filtración glomerular^{38, 39, 40, 41 y 46}.

REFERENCIAS

1. Paschkis, E. K.: *Clinical Endocrinology*. Second. Edition. Hoeber. Harper. 1958.
2. Terapéutica Corticoesteroidea. *Principios básicos y conceptos actuales*. Editado por los laboratorios Pfizer.
3. Jeffries, Mck. W.: *The New England Journal of Medicine*. 253:11.
4. Refuss, E. M.: *A course in practical therapeutics*. Third edition. The Williams and Wilkins Company. 1958.
5. Fried, J. and Borman, A.: *Vitamins and Hormones*. Edited by Harris, S. R., Marrian, F. G. Academic. Press. New York. 1958. Hogg, J. A. and others, J.: *Am. Chem. Soc.* 77, 6401-6402. 1955 citado por⁵. Byrnes, W. W. and others. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91, 67-70. 1956. Citado por⁵. Liddle, G. W. and others. *Metabolism. Clin. Exptl.* 5, 384-394. Citado por⁵. Spero, G. B. and others. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 6213-6214. 1956. Citado por⁵. Spero, G. B. and others. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 1515-1516. 1957. Citado por⁵.
6. Ruch, C. T. Fulton, F. J.: *Medical Physiology and Biophysics*. eighteenth. edition. W. B. Saunders. Company. 1960.
7. Fruton, S. J. and Simmonds, S.: *General Biochemistry*. Second edition. John. Wiliev. & Sons. Inc. New York. 1958.
8. Fried, J., and Sabo, E. F.: *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2273-2274. 1953.
9. Dulin, E. W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92. 115-117. 1955.
10. Boland, F. W., Weadley, N. E.: *Ann. Rheumat. Dis.* 13, 291-296, 1954.
11. Stafford, R. O., Barnes, L. E., Bowman, B. J., Meinzienger, M. M. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 89, 371-374. 1955.
12. Thorn, G. W. and others : *Ann. Int. Med.* 43:979-1000. 1955.
13. Hart. D. F. and others.: *The Lancet*. Sept. 2. pag. 495-496. 1958.
14. Vega, N. C.: *La Prensa Médica Argentina*. 46:7, 411-416. 1959.
15. Bernstein, S. and others. *J. Am. Chem. Soc.* 78:5693-5694. 1956.
16. Wozmiak, A. L., Paino, A., Ringler, I., Reepke, R. R.: *Federation Proceedings*. 17:1. Part. 1,421. 1958.
17. Hellman, L., Zumofe, B., Schwartz, and Gallagher, F. T.: *Ann. Rheumatci. Dis.* 16:141. 1957.
18. Pelaez, L. J.: *Revista. Clínica Española*. 73:3, 215-219. 1959.
19. Feinberg, M. S., Feinberg, R. A. May. 3, J.A.M.A. Pag. 58-59.
20. Uribe, F., Soto, R., Gordillo, G., Murillo, P.: *Boletín Médico del Hospital Infantil*. 16:3, 593-603. 1959.
21. McGavack, T. H., Kao, K. T., Leake, D. A., Bauer, H. G., and Berger H. E. *Am. J. Med. Sci.* 236:6, 720. 1958.

22. Kupperman, S. H., Ho., P. P., Epstein, A. J.: *Metabolism. Clinical and Experimental*. 7:4. Part. 1. 1958.
23. Inagaki, Katsuhiko.: *Yokohama Medical Bulletin*. 8:3. 151-158. 1957.
24. Landauer, W.: *Endocrinology*, v41. 489. 1957.
25. Caballero, C., Di Marco, F. L. and Sala, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 81:619. 1952.
26. Sames, L. G., Leathem, H. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 78:231. 1951.
27. Donowski, S. T., Greenman, L. Tarail, R. Mateer, E., Ward, N. and Youngner, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77: p. 8, 1951.
28. Evans, H. J.: *Proc. Exp. Biol. and Med.* 83:31. 1953.
29. Karnofski, D. A., Ridgway, L. D., and Patterson, P. A., *Endocrinology* 48: 596, 1951.
30. De Francis, P., Landauer, W. *Nature, Lond.* 183; 617, 1959.
31. Ipagawal, A., Monga, J. N.: *The Indian Journal of Medical. Research* 46:5, 1958.
32. Guzmán, J. y Col. Para ser publicado.
33. Beveridge, W. I. B., Burnet, F. M. *Spec. Ses. Series Coun. London* 14, 256, 1946.
34. Operating Directions for the Coleman Model 21 flame photometer. Coleman Instruments, In. Maywood, Illinois. U. S. A. 1954.
35. Croxton, E. F. *Elementary Statistics with Applications in Medicine*. Prentice-Hall Inc. New York. 1954.
36. Huettner, F. A. *Fundamentals of Comparative Embryology of the Vertebrates*. The Macmillan Company. 1950.
37. Kagawa, M. C. and Van Arman.: *Proc. oc. Exp. Biol. and Med.* 94:683, 1957.
38. Bland, H. J.: *Clinical Recognition and Management of Disturbances of Body Fluids*. W. B. Saunders Compay 1958..
40. Davis, O. J., Howell, S. D.: *Endocrinology* 53:653, 1953.
41. Garrod, C. Davis, A. S. and Cahill, G. J.: *Clin Invest.* 34: 761, 1955,
42. Raiz, L. G. McNelly, F. M. and Rosenbam.: *J. Clin. Invest.* 36:767, 1957.
43. Levitt, F. M. and Bader, E. M.: *Am. J. of Med.* 11:715, 1951.
45. Reinberg, J. Ghata, J. Lestradet, H. Azerat, E. *Sem. Hop. Paris.* 30:1366, 1954.
46. Kowalski, J. H., Reynolds, E. W. and Rutstein, D. D. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83:795, 1953.
47. Harrop, G. A., Cold Harbor Spring Harbor Symposia *Quant. Biol.* 5:375. 1937. Citado por 37.
48. Roberts, K. E. Pitts, F. R.: *Endocrinology.* 56:51, 1958.
49. Thorn, G. W., Forsham, H. P., Bennett, L. L., Roche, M., Reiss, S. R., Slessor; A., Flink, B. F. and Somerville, W. *Tr. A. Am. Physicians* 62:233, 1949.
50. Ross, E. J. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 20:229, 1960.
51. Uete, T. and Venning, H. E. *Endocrinology* 67:63, 1960.
52. Haller, H. Hewer, F. T. Hughes, M. J. and Schnieden, .H. *The J. of Endocrinol.* 15:3, Lviii, 1957.
53. Nehr, R., Meystre, Ch. and Wettstein, A. *el. Chim. Acta* 42:132, 1959.
54. Bernstein, S. *Recent Progress in Hormone Research* 14:1, 1958.