

## Desarrollo y control de calidad de un radioinmunoensayo para la medida de digoxina endógena

M. J. Baz, F. Vargas, J. M. Haro, M. A. Castillo, E. Jódar, J. L. Andrade y C. García del Río\*

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad de Granada  
18012 Granada (España)

(Recibido el 27 de julio de 1990)

M. J. BAZ, F. VARGAS, J. M. HARO, M. A. CASTILLO, E. JÓDAR, J. L. ANDRADE and C. GARCÍA DEL RÍO. *Measurement of Digoxin-Like Factor in Plasma and Urine by Radioimmunoassay*. Rev. esp. Fisiol., 46 (4), 385-392, 1990.

It has been suggested that sodium renal excretion is regulated, at least partially, by a factor with natriuretic properties called digoxin-like factor (DLF). As this substance crossreacts with digoxin antibodies, it was measured with a radioimmunoassay used to determine exogenous digoxin. Methodological conditions and quality control to determine DLF in plasma and urine have been established. Good correlation coefficients in specificity as well as dilution studies were obtained. Within —and between— assay coefficients of variations indicate good reproducibility. Moreover, changes in plasma DLF levels were detected in patients with cirrhosis or with renal failure, diseases which thrive on alterations in salt and water metabolism. In conclusion, this radioimmunoassay method for measuring DLF may be useful to investigate the role of this factor in several physiological and pathological conditions.

Key words: Digoxin, Digoxin-like, Radioimmunoassay.

La excreción renal de sodio parece estar regulada por cambios en el volumen de filtrado glomerular y en la secreción de aldosterona y además por un agente humoral estimulado, posiblemente, por la expansión del volumen extracelular, habiéndose encontrado actividad biológica en extractos de plasma y orina. Este factor

se ha llamado hormona natriurética (17) o digoxina endógena, por su actividad similar a los digitálicos inhibiendo la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa (2).

Paralelamente, se ha descubierto que péptidos atriales (ANP) poseen actividad natriurética y vasodilatadora (3) afectando la excreción de sodio y la presión arterial, mediante la inducción de cambios hemodinámicos (17). Estos factores natriuréticos

\* A quien debe dirigirse la correspondencia.

cos son diferentes del factor natriurético similar a la digoxina.

Fue SMITH (14) quien sugirió por primera vez la existencia de una hormona natriurética «X» como explicación al fenómeno de escape de sodio a la aldosterona.

La naturaleza de este factor endógeno similar a la digoxina no se conoce, pero todos los autores que han intentado caracterizarla física y químicamente están de acuerdo en que se trata de una sustancia de bajo peso molecular (< 1000 Da), soluble en agua, estable al calor y no digerible por enzimas proteolíticas (1, 15). Su origen es desconocido, pero podría ser producida por el hipotálamo (9).

Para la determinación de este factor se han utilizado diversas técnicas aprovechando su capacidad de inhibir la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa (17). Pero desde que se observó que esta sustancia presentaba reacción cruzada con los anticuerpos antidigoxina (2), el método más empleado para su cuantificación consiste en la determinación de los niveles de digoxina endógena en sangre y orina, utilizando para ello el radioinmunoanálisis de digoxina (6, 8, 13).

En el presente trabajo nos propusimos establecer las condiciones metodológicas, mediante un exhaustivo control de calidad, para la medida de la digoxina endógena tanto en el plasma como en la orina, por un RIA que se utiliza para la determinación de digoxina exógena. Finalmente, con objeto de validar la técnica para una posible aplicación clínica, se midieron los valores de digoxina endógena en sujetos normales y en pacientes con insuficiencia renal o cirrosis, enfermedades que cursan con cambios en el volumen circulante eficaz (5, 11, 12).

### Material y Métodos

*Muestras sanguíneas y urinarias.* — El estudio se realiza en muestras de suero y plasma heparinizado, y en orina de 24 ho-

ras, de 18 sujetos sanos (9 varones y 9 hembras) sin control de dieta, que no tomaban ningún fármaco o droga en el momento del estudio, cuyas edades oscilaban entre los 18 y 26 años (edad media 22 años). Para estudiar la influencia del tiempo que transcurre desde la extracción de la muestra hasta la determinación analítica, se consideran periodos de tiempo a las 0, 1, 2 y 6 horas; asimismo se determina la influencia de la temperatura sometiendo una mezcla de plasmas a 2 horas de calentamiento en un baño de agua a 24, 40, 50, 60 y 70 °C. Para estudiar la influencia que los distintos pH fisiológicos de la orina pudieran ejercer sobre los valores de la digoxina endógena, se incubó la orina durante 20 horas a temperatura ambiente y a 60 °C con un pH entre 4-8.

Por otra parte, para observar la posible aplicación clínica del RIA se midieron los niveles de este factor en muestras procedentes de 22 pacientes con insuficiencia renal crónica y de 16 con cirrosis. En ambos grupos el único requisito considerado era que no estuviesen bajo tratamiento con digital.

*Procedimiento de extracción.* — Las muestras plasmáticas fueron extraídas y concentradas mediante etanol (3 ml de plasma o suero y 12 ml de etanol absoluto al 98 % frío, dejándolo en agitador rotativo durante 15 min y centrifugando 10 min a 3500 rpm), para eliminar lípidos y proteínas del medio, así como otras moléculas de alto peso molecular que pudieran interferir. Posteriormente, fueron desecadas por corriente de aire en baño a 37 °C. La orina se guardó congelada a -20 °C hasta el momento del RIA para su medición directa.

Para estudiar la influencia del procedimiento de extracción añadimos digoxina marcada con  $\text{I}^{125}$  en cantidades de 14416 y 58202 cpm a 10 muestras plasmáticas antes del procedimiento, obteniendo el porcentaje de recuperación tras medida de la radioactividad en el extracto seco.

*Procedimiento del radioinmunoanálisis.*

— Los niveles de digoxina endógena se determinaron mediante un RIA comercial para la medida de digoxina exógena en suero humano (Digoxin Maia kit Sero Diagnostic), que utiliza digoxina marcada con  $I^{125}$ , anticuerpo unido covalentemente a partículas magnéticas y método de separación del antígeno libre del unido al anticuerpo, basado en la simple aplicación de un campo magnético.

*Control de calidad del RIA.* — Sensibilidad: fue obtenida proyectando sobre la curva patrón (utilizando 14 RIAs) mediante interpolación parabólica de los puntos, el error del punto cero. La dosis que se obtiene con tal lectura es la más pequeña que es posible detectar, no siendo igual a cero.

—Índice de precisión metodológica: se obtuvo calculando el valor medio de los coeficientes de variación entre cada dos duplicados de todas las muestras de una misma experiencia.

—Precisión. — Intra-ensayo: se analizaron dos mezclas de plasmas 8 veces en un mismo experimento, la A perteneciente a individuos sanos y la B a enfermos tratados con digoxina exógena. Entre-ensayos: se utilizaron las dos mezclas de plasmas anteriores en 8 ensayos diferentes.

—Especificidad: La especificidad se analizó mediante tres pruebas distintas: a) recuperación: se añadieron 4 cantidades conocidas de digoxina exógena (416,6; 833,3; 1666,6 y 3333,3 pg/ml) a dos plasmas con distintos niveles de digoxina endógena antes de la extracción de la muestra. b) dilución: a partir de distintos volúmenes de plasma (1, 2, 4 y 6 ml) de una misma mezcla de plasmas se separaron 4 alícuotas y se introdujo cada una de ellas en un ensayo distinto, manteniendo siempre la misma constante de dilución. En otros 3 experimentos, 3 extractos plasmáticos distintos se diluyeron en tampón fosfato a 1/2, 1/4 y 1/8, e igualmente 3 muestras de orina se diluyeron seriada-

mente con agua bidestilada. c) reactividad cruzada del anticuerpo antidigoxina del kit, con varios posibles interferentes.

*Métodos estadísticos.* — Se utilizó el test de Student para datos apareados en la comparación de los niveles de digoxina endógena en plasma heparinizado y suero; análisis de la varianza de dos vías para la influencia del tiempo y la temperatura. Para la sensibilidad se tomó la media y desviación estándar de las 14 curvas patrón. El índice de precisión metodológico se estudió mediante el coeficiente de variación, al igual que la precisión intra e inter-ensayo. Para pruebas de recuperación y de dilución se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

## Resultados

*Obtención de la muestra.* — Se observa una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) entre los niveles de digoxina endógena detectados en las muestras de plasma heparinizado ( $196 \pm 33,4$ ) y suero ( $146 \pm 54,8$ ). Sin embargo, el tiempo comprendido desde la extracción de las muestras y las 6 horas posteriores, así como los cambios de temperatura entre 20 y 70 °C no influyeron en los niveles de este factor. Tampoco se observan diferencias por la influencia de los distintos pH fisiológicos de la orina (entre pH 4-8), sobre los valores de digoxina endógena.

*Procedimiento de extracción.* — Las pruebas de recuperación, añadiendo digoxina marcada con  $I^{125}$  a las muestras plasmáticas, permitieron detectar un 90,01 % de las cpm previamente añadidas antes de la extracción.

*Control de calidad.* — El estudio estadístico de las 14 curvas estándar demuestra buena reproducibilidad con un índice de precisión metodológica de  $2,34 \pm 1,24$  y una sensibilidad de  $83 \pm 81$  pg/ml. En el análisis de la precisión intra- y entre-en-

Tabla I. *Precisión intra- y entre-ensayo para dos niveles distintos de digoxina endógena (A, niveles normales y B, niveles altos).*

n = número de casos;  $\bar{x}$  = media; DE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación en %.

	Intra-ensayo		Entre-ensayo	
	A	B	A	B
n	8	8	8	8
$\bar{x}$	233,3	1084,9	278,3	1295,6
DE	11,6	59,8	22,4	85,4
CV	5,0	5,5	8,0	6,6

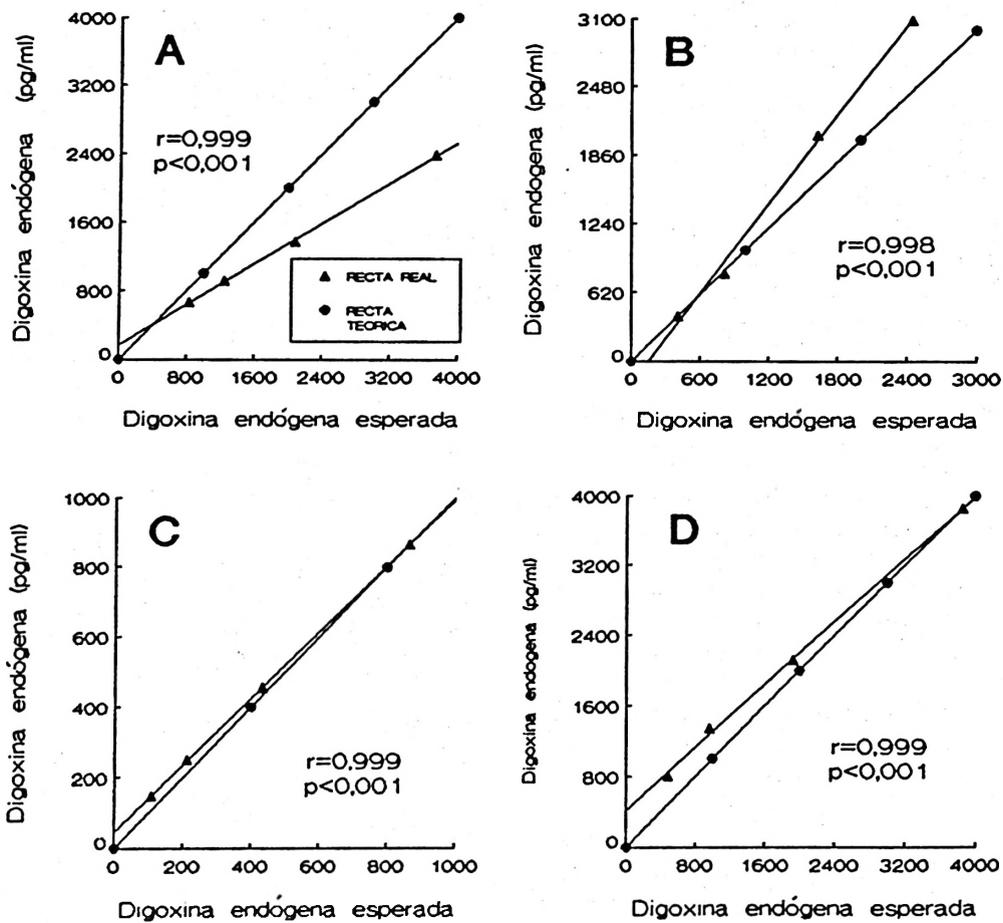


Fig. 1. *Recuperación y especificidad de un RIA para la medida de digoxina endógena.* A) Recuperación añadiendo diferentes cantidades de digoxina exógena a 2 mezclas de plasma. B) Análisis de regresión con diferentes volúmenes de plasma. C) Análisis de regresión con diferentes diluciones del extracto plasmático. D) Análisis de regresión lineal con diferentes diluciones de orina.

sayo no se encuentran diferencias significativas (tabla I).

El estudio de especificidad muestra que, mediante las pruebas de recuperación del RIA añadiendo cantidades conocidas de digoxina exógena antes de la extracción, se obtiene una recuperación del  $70,1 \pm 0,7\%$  con buena correlación lineal entre la digoxina añadida y la medida (fig. 1A); y que en las pruebas de dilución a partir de distintos volúmenes de plasma, los valores esperados de digoxina endógena se acercaron a los valores medidos y guardaron una buena linealidad (fig. 1B). De la dilución de los extractos plasmáticos y de las muestras de orina se obtuvieron, igualmente, unos coeficientes de regresión cercanos a 1 entre los valores esperados y los medidos, siendo los límites de fiabilidad bastante aceptables para cada uno de los valores de la dilución (fig. 1C-D).

La reactividad cruzada del anticuerpo antidigoxina del kit con posibles interferentes como digitoxina y lanatósido C fue del 8,3 y 93 %, respectivamente.

*Aplicación biológica.* — Los niveles de digoxina endógena se encontraron elevados entre 2-3 veces en los pacientes con

insuficiencia renal, respecto a los sujetos controles (fig. 2). En los pacientes cirróticos, igualmente, se observa un aumento significativo de este factor respecto al grupo control (fig. 2).

### Discusión

Durante los últimos años se han publicado varios trabajos sobre el desarrollo de métodos radioinmunológicos, para la medida de una sustancia endógena semejante a la digoxina (6, 8, 13), aprovechando su característica biológica de dar reacción cruzada frente a anticuerpos antidigoxina. En lo que se refiere a la medida en plasma, la mayor parte de los autores incluyen extracción y concentración de la muestra plasmática mediante técnicas engorrosas de difícil utilización en laboratorios de tecnología media, como HPLC (7), o que son antieconómicas en tiempo y capacidad de procesamiento de varias muestras a la vez, como paso por columnas de Sephadex (10). En el presente trabajo se describe un método de extracción simple y un RIA sencillo, para la medida de digoxina endógena, que permite y facilita determinaciones simultáneas de esta sustancia, tanto en sangre como en orina.

Con las muestras plasmáticas es preciso tener en cuenta el anticoagulante utilizado, para poder comparar resultados, mientras que la muestra no se afecta si llega al laboratorio en las primeras 6 horas, por lo que respecta a la temperatura. Respecto a la extracción se debe partir siempre del mismo volumen plasmático o al menos mantener la misma constante de dilución del extracto entre otras cosas, porque la fuerza iónica y la concentración de otras sustancias del medio pueden alterar la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. En las muestras de orina no se utiliza ningún método de extracción por considerarse un material normalmente libre de proteínas y lípidos. Tampoco se utiliza ningún método de concentración, ya que

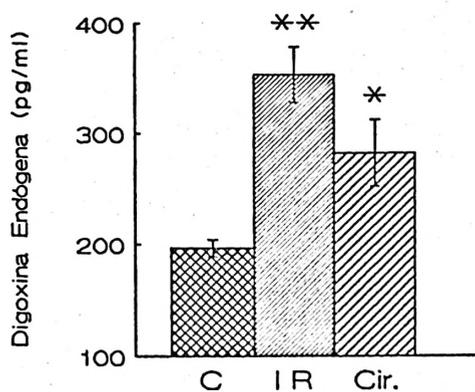


Fig. 2. Niveles plasmáticos de digoxina endógena en sujetos control (C), pacientes con insuficiencia renal (IR) y cirróticos (Cir.).

Los datos son media  $\pm$  EE. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  vs. controles.

como la aldosterona, se encuentra en niveles del orden de los nanogramos, lo que permite una medición adecuada.

La recuperación de todo el proceso muestra un  $70,1 \pm 0,7$  %. Aunque este porcentaje pudiera parecer poco efectivo se observa muy buena correlación lineal entre la digoxina añadida y la medida, ya que es preferible un porcentaje de recuperación bajo, pero reproducible, a un porcentaje alto con amplias variaciones y posibilidad de resultados falsos positivos.

El coeficiente de variación hallado en la precisión en el ensayo es aceptable si bien es mayor (5 %) que el obtenido para el índice de precisión metodológica (2,34 %). Esta variación podría deberse a una menor precisión de los valores obtenidos para los plasmas en relación a la mayor precisión en los valores estándar, producido quizás por posibles interferencias de componentes plasmáticos o de extractos que puede haber en la reacción antígeno-anticuerpo. La precisión entre-ensayos indica buena reproducción apoyando la validez del método de análisis.

En el estudio de aplicación biológica varios autores encuentran una elevación de los niveles de digoxina endógena en enfermos con insuficiencia renal (5, 11) y discuten el posible papel de esta sustancia en la natriuresis observada en esta patología. El incremento en los niveles de digoxina endógena respecto al grupo control (fig. 2), es un dato que se aporta para dar validez metodológica a la técnica, sin entrar en implicaciones fisiopatológicas. En cuanto a los niveles en cirróticos, no hallamos una disminución (fig. 2) como cabría esperar de acuerdo con la disminución del volumen circulante que presentan y con otros datos descritos (12). Esta discrepancia puede ser debida a que, en este grupo, no se tuvo en cuenta la posible existencia de patología asociada.

Sin embargo, se ha podido observar que dicho factor medido con el mismo RIA, se encuentra elevado en ratas tanto hipertensas como normotensas a las cuales se les

substituye el agua de bebida por una solución salina de ClNa al 1 % (16).

En resumen, el radioinmunoensayo para la digoxina adaptado por nosotros para la medida de la digoxina endógena en el plasma y orina de sujetos normales se muestra preciso, fiable y útil para este fin.

### Resumen

Se establecen las condiciones metodológicas mediante un control de calidad para la medida de la digoxina endógena, tanto en plasma como en orina. Se obtienen unos coeficientes de correlación cercanos a 1 en el estudio de especificidad, tanto en pruebas de recuperación como de dilución. Igualmente, los coeficientes de variación, tanto intra- como inter-ensayo, indican una buena reproducibilidad, habiéndose encontrado, además, cambios en los niveles de este factor en situaciones fisiopatológicas que cursan con alteraciones del metabolismo hidrosalino, como cirrosis e insuficiencia renal. En conclusión, la adaptación del RIA descrito resulta preciso, fiable y útil para la medida de la digoxina endógena.

Palabras clave: Digoxina, Digoxina endógena, Radioinmunoensayo.

### Bibliografía

1. Bourgognie, J. J., Hwang, K. H., Ipkchi, E. y Bricker, N. S.: *J. Clin. Invest.*, 53, 1559-1567, 1974.
2. Buckalew, V. M. y Gruber, K. A.: En «The kidney in liver disease». (3a ed.) (Epstein, M., ed.). Williams y Wilkins, Baltimore, 1984. pp. 417-428.
3. de Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T. y Sonnenberg, G. H.: *Life Sci.*, 28, 89-94, 1981.
4. Flier, J. S., Marathos-Flier, E., Pallota, J. A. y McIssaac, D.: *Nature*, 279, 341, 1979.
5. Graves, S. W., Brown, B. A. y Valdes, R. Jr.: *Ann. Int. Med.*, 99, 604-608, 1983.
6. Graves, S. W., Valdes, R., Brown, B. A., Knight, A. B. y Graig, H. R.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58, 748-751, 1984.
7. Gruber, K. A. y Buckalew, V. M. Jr.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 159, 463-467, 1978.
8. Gruber, K. A., Whitaker, J. M., Plunket, W.

- C. y Buckalew, V. M. Jr.: *Kidney Int.*, 16, 817-822, 1979.
9. Hauper, G. T. Jr. y Sancho, J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4658-4660, 1979.
  10. Kramer, H. J., Rietzel, C., Klingmuller, D. y Dusing, R.: En «Hormonal regulation of sodium excretion». (Lichardus, B., Scherier, R. W. y Ponec, J., eds.). Elsevier/North-Holland, Nueva York, 1980, pp. 313-332.
  11. Kramer, J. H., Penning, P., Klingmuler, D., Kipnowski, J., Glauzer, K. y Dusing, R.: *Nephron*, 40, 297-302, 1985.
  12. Naccarato, R., Messa, P., D'Angelo, A., Fabris, A. y Messa, M.: *Gastroenterology*, 81, 205-210, 1981.
  13. Pudek, M. R. y Seccombe, D. W.: *N. Engl. J. Med.*, 308, 904-905, 1983.
  14. Smith, H.: *Am. J. Med.*, 23, 623-652, 1957.
  15. Valdes, R. Jr., Graves, S. W. y Becker, S. L.: *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 60, 1135-1143, 1985.
  16. Vargas, F., Casanova, I., Haro, J. M. y García del Río, C.: *Horm. Metab. Res.*, 22, 352-355, 1990.
  17. Wardener, H. E. de y Clarkson, E. M.: *Physiol. Rev.*, 65, 658-759, 1985.

