

## Determinación de la arginina-vasopresina en pequeños volúmenes de plasma de rata

J. Camps \*, J. Solá, V. Arroyo, J. Gaya, A. Rimola, J. Rodés y F. Rivera

Unidad de Hepatología y Laboratorio Hormonal  
Hospital Clínico y Provincial  
Barcelona

(Recibido el 1 de julio de 1985)

J. CAMPS, J. SOLA, V. ARROYO, J. GAYA, A. RIMOLA, J. RODES and F. RIVERA. *Arginine-Vasopressin Determination in Small Volumes of Rat Plasma*. Rev. esp. Fisiol., 42 (3), 323-328, 1986.

A radioimmunoassay to determine arginine-vasopressin concentration in rat plasma is described. This method was a modification from a previously described technique from which the incubation volume was reduced. It allows us to use only 300  $\mu$ l of plasma, 1/4 of the original volume, without any impairment to the sensitivity. The intra- and inter-assay coefficients of variation are 11 % and 13 % respectively. The accuracy ranges between 90 and 99 %. To investigate the influence of sampling blood conditions on arginine-vasopressin levels, five groups of Sprague-Dawley rats are analyzed: Group I, decapitation; Group II, ether anaesthesia and cardiac puncture; Group III, ether anaesthesia and decapitation; Group IV, ketamine anaesthesia and cardiac puncture; Group V, ketamine anaesthesia and decapitation. Arginine-vasopressin levels in Group V ( $2.2 \pm 0.8$  pg/ml) are significantly lower than those from the other four groups and similar to those obtained by other authors using a chronic catheter.

**Key words:** Arginine-vasopressin, Rats, Radioimmunoassay.

En los últimos años se ha realizado un considerable avance en el conocimiento de las funciones fisiológicas de la arginina-vasopresina (AVP) y su papel en el desarrollo de diversos procesos patológicos en el hombre y en el animal de experimentación (7, 13, 14). Estos progresos han venido condicionados, en buena medida, por el desarrollo de técnicas

de radioinmunoanálisis que han permitido una medición sensible y precisa de la concentración plasmática de AVP (1, 2, 6, 8, 12).

Sin embargo, la realización de estudios en pequeños animales de experimentación presenta importantes problemas. Por un lado, todos los métodos para la determinación de la concentración plasmática de AVP descritos hasta el momento precisan de importantes volúmenes de plasma —entre 1 y 2 ml como mínimo—, de los que no siempre se dispone cuando se trabaja con animales pequeños. Por otro

\* Correspondencia: J. Camps, Unidad de Hepatología, Hospital Clínico y Provincial. 08036 Barcelona (España).

lado, la metodología seguida en la toma de muestra sanguínea puede dar lugar a modificaciones en la secreción de esta hormona. Se ha referido, por ejemplo, que la exposición de estos animales al éter puede producir variaciones en los niveles plasmáticos de AVP (10).

Recientemente, nuestro grupo ha descrito un radioinmunoanálisis para la determinación de la concentración plasmática de AVP en el hombre (5). En el presente trabajo, se estudia una modificación realizada en este método, con el objeto de reducir el volumen mínimo de muestra necesario, así como diferentes métodos de extracción de muestras sanguíneas en la rata, con el objeto de establecer un sistema que no interfiera en la secreción de esta hormona.

### Material y Métodos

**Métodos de extracción sanguínea.** — Se estudian 43 ratas Sprague-Dawley macho de 250-300 g que tuvieron libre acceso a comida y bebida. Los animales se dividieron en cinco grupos: *Grupo I* (n = 5): Se procedió a su decapitación inmediata y la sangre aórtica fue tomada del tronco. *Grupo II* (n = 13): Los animales fueron anestesiados con éter (60-75 s de inhalación), extrayéndose seguidamente una muestra sanguínea (1 ml) por punción cardíaca con una aguja 25 G. *Grupo III* (n = 5): Las ratas se anestesiaron con éter (60-75 s de inhalación), extrayéndose después la sangre troncal por decapitación. *Grupo IV* (n = 5): Se procedió a anestesiarse a los animales con una inyección intramuscular de 25 mg de ketamina (Ketolar®, Parke Davis), tras lo cual se les extrajo una muestra de sangre por punción cardíaca. *Grupo V* (n = 15): Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intramuscular de 25 mg de ketamina, siendo después sacrificadas por decapitación para la obtención de la sangre troncal.

Todas las muestras de sangre se recogieron en tubos de plástico heparinizados y se centrifugaron a  $2.000 \times g$  durante 10 minutos a 4°C. El plasma se conservó 1 ó 2 semanas a -20°C hasta la determinación de la concentración plasmática de AVP.

**Radioinmunoanálisis.** — La técnica usada para la determinación de la concentración plasmática de AVP (5) fue modificada con el objeto de reducir el volumen de muestra necesario reduciendo los volúmenes de los componentes de la mezcla de incubación hasta establecer el volumen mínimo que no afectase significativamente los criterios de validez del método. Se estudió la correlación obtenida al determinar por ambos métodos los niveles de AVP en 29 plasmas de rata dentro de un amplio margen de concentraciones de hormona.

**Análisis estadístico.** — Los resultados obtenidos se expresan como media  $\pm$  DS. La comparación entre grupos se realizó por el test de la «t» de Student para datos independientes en el caso de que las muestras siguiesen una distribución normal, y por el test de Mann-Whitney en el caso de que siguiesen una distribución no paramétrica. La normalidad de las distribuciones se comprobó con el test de Kolmogorov. La correlación entre dos variables se evaluó por el análisis simple de la regresión lineal.

### Resultados

**Métodos de extracción sanguínea.** — Los niveles de AVP más bajos y homogéneos se encontraron en el grupo V, correspondiente a los animales anestesiados con ketamina y en los que la sangre se obtuvo por decapitación ( $2,2 \pm 0,8$  pg/ml). Las diferencias fueron significativas entre los animales pertenecientes a este grupo y los de otros cuatro grupos (*Grupo I*,  $6,4 \pm 5,9$  pg/ml;  $p < 0,05$ ).

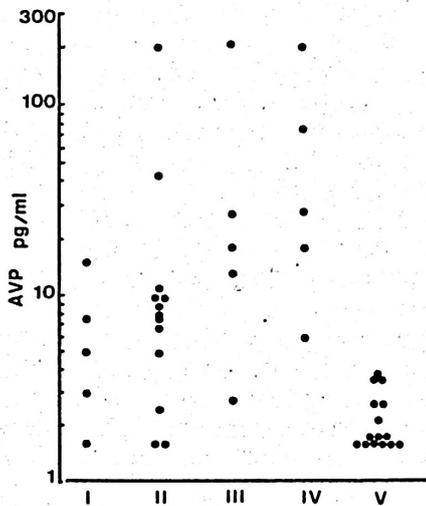


Fig. 1. Concentración plasmática de AVP en ratas empleando diferentes métodos de extracción de las muestras sanguíneas.

Grupo II,  $25,1 \pm 57,1$  pg/ml;  $p < 0,001$ .  
 Grupo III,  $54,6 \pm 88,4$  pg/ml;  $p < 0,01$ .  
 Grupo IV,  $67,8 \pm 82,9$  pg/ml;  $p < 0,01$ .  
 En éstos, se hallaron niveles marcadamente superiores de concentración plasmática de AVP (fig. 1).

**Radioinmunoanálisis.** — La figura 2 muestra el efecto de la disminución del volumen de los componentes del medio de incubación. La reducción de volumen de patrón y de antisuero a 25  $\mu$ l y de hormona marcada a 50  $\mu$ l significó un aumento en cuatro veces de la sensibilidad del ensayo y por consiguiente una reducción en cuatro veces el volumen mínimo de muestra necesario para el radioinmunoanálisis, que pasó de 1,2 ml a 300  $\mu$ l de plasma. Menor volumen de hormona marcada originó curvas patrón no satisfactorias, probablemente debido al bajo número de cuentas por minuto. El método modificado presentó un coeficiente de variación intraensayo del 11 % (controles:  $9,5 \pm 1,1$  pg/ml) y un coeficiente de variación interensayo del 13 % (contro-

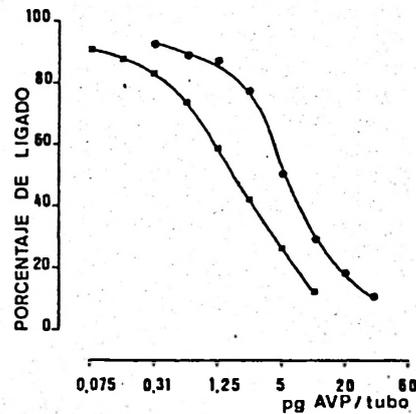


Fig. 2. Efecto de la reducción de los volúmenes de los componentes del medio de incubación sobre la sensibilidad del radioinmunoensayo. En el método original, el medio de incubación contenía 100  $\mu$ l de patrón, 100  $\mu$ l de hormona marcada y 100  $\mu$ l de antisuero. En el método modificado, contenía 25  $\mu$ l de patrón, 50  $\mu$ l de hormona marcada y 25  $\mu$ l de antisuero. (●—●) método original; (■—■) método modificado.

Tabla I. Recuperación (%) del radioinmunoanálisis modificado a distintas concentraciones de patrón.

Patrón (pg/ml)	Recuperación (n = 5)
3,1	96,8 $\pm$ 7,0
6,2	94,9 $\pm$ 10,5
12,5	99,9 $\pm$ 12,1
25,0	90,7 $\pm$ 9,6
50,0	99,6 $\pm$ 6,4
100,0	94,6 $\pm$ 6,9
200,0	98,0 $\pm$ 16,5
400,0	91,5 $\pm$ 15,4

les:  $9,3 \pm 1,3$  pg/ml). La exactitud de la técnica, medida por el porcentaje de recuperación, se indica en la tabla I.

La correlación entre los niveles de AVP obtenidos en 29 plasmas de rata cuando se analizaron por el método original y por el método modificado fue de 0,99, y la recta de regresión obtenida no difirió de la línea de identidad (fig. 3).

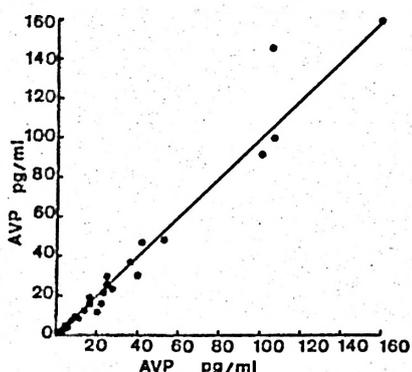


Fig. 3. Correlación entre los niveles plasmáticos de AVP obtenidos mediante el método original (abscisas) y el método modificado (ordenadas).  
 $r = 0,99$ ;  $p < 0,001$ ;  $Y = 0,9 X + 1,0$

### Discusión

Es bien conocido que diversos tipos de estrés pueden afectar la función de diversos sistemas hormonales. Estudios previos en rata han demostrado que la compresión del tórax durante más de 5 s, para su decapitación puede aumentar de modo importante la secreción de AVP (9). Asimismo, la administración de anestésicos puede influir en los niveles plasmáticos de esta hormona (3, 10, 11, 15). Nuestros resultados indican que la utilización de ketamina como anestésico y la decapitación como sistema de obtención de las muestras sanguíneas no modifica la concentración plasmática de AVP. Los niveles obtenidos mediante este sistema ( $2,2 \pm 0,8$  pg/ml) son similares a los descritos por otros autores que conseguían las muestras de sangre mediante la colocación de un catéter crónico ( $1,68 \pm 1,17$  pg/ml) y que han sido aceptados como niveles basales normales de AVP en la rata en ausencia de estrés (4). Las otras técnicas de extracción de muestras estudiadas producen un marcado aumento de la secreción de AVP. La decapitación sin anestesia incrementó los ni-

veles de esta hormona en 3 de 5 animales; hecho que puede estar relacionado con la compresión torácica a que se somete a las ratas para su decapitación, cuando los animales están conscientes, y a la dificultad de llevarla a cabo en menos de 5 segundos. La utilización de ketamina y punción cardíaca aumentó los niveles de AVP en todos los animales, debido quizás a un efecto directo de la punción más que del anestésico, tal como ocurre en la venipunción que puede incrementar la secreción de AVP en el hombre y en el animal de experimentación (9). Por último, cuando se utiliza éter como anestésico, se observa un incremento en la concentración plasmática de AVP en un porcentaje importante de animales, sea cual fuere el sistema de obtención de las muestras de sangre. Estos resultados parecen contradecir los descritos por otros autores (3, 10); sin embargo, en nuestro estudio no es posible discernir si este estímulo es debido al éter *per se* o al estrés producido en los animales al ser introducidos en la cámara en la que inhalan el anestésico.

Además de la influencia de los métodos de extracción sanguínea, existen otros problemas en el desarrollo de técnicas de radioinmunoanálisis para la determinación de los niveles de AVP en plasma de rata. La concentración plasmática de esta hormona es muy baja, por lo que se requieren anticuerpos de elevada afinidad y métodos de extracción de la hormona que permitan concentrarla dentro de los límites de detección del ensayo. En un trabajo reciente (5) se describió un radioinmunoanálisis para la determinación de AVP en extractos etanólicos de plasma, utilizando 300  $\mu$ l de extracto correspondiente a 1,2 ml de plasma si las muestras se concentran cuatro veces. Sin embargo, cuando se realizan estudios en pequeños animales de experimentación no suele disponerse de un volumen de plasma tan importante ya que, aunque por decapitación suelen obtenerse de 3 a 5

ml, deben repartirse entre todo un conjunto de mediciones analíticas. Gracias a las modificaciones descritas en el presente artículo, se ha conseguido reducir el volumen de muestra necesario a una cuarta parte, es decir, 75 µl de extracto ó 300 µl de plasma, sin empeorar la calidad del método ni en su precisión ni en su exactitud. Existe también una correlación excelente entre los valores de de AVP obtenidos mediante la técnica original y la modificada.

En conclusión, en el presente trabajo se establece una metodología para la extracción de muestras sanguíneas para la determinación de la concentración plasmática de AVP en la rata de fácil aplicabilidad y que no produce ninguna influencia en la secreción de esta hormona y se describe un radioinmunoanálisis sensible y fiable para su determinación en pequeños volúmenes de plasma.

*Agradecimientos*

Durante la realización del presente trabajo, J. Camps fue becado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (1214/82) y J. Solá por la «Fundació Catalana per l'Estudi de les Malalties del Fetge».

**Resumen**

Se describe para la determinación de AVP en plasma de rata un radioinmunoanálisis, modificando una técnica descrita anteriormente, reduciendo el volumen de incubación a 300 µl de plasma, una cuarta parte del volumen requerido en el método original, sin que se produzca un deterioro de su sensibilidad. El coeficiente de variación intraensayo es del 11 % y el coeficiente de variación interensayo del 13 %. La exactitud está entre el 90 y el 99 %. Se investiga la influencia del método de extracción sanguínea sobre los niveles plasmáticos de arginina-vasopresina, en cinco grupos de ratas Sprague-Dawley: I, decapitación; II, anestesia con éter y

punción cardíaca; III, anestesia con éter y decapitación; IV, anestesia con ketamina y punción cardíaca; V, anestesia con ketamina y decapitación. Los valores de arginina-vasopresina en el grupo V ( $2,2 \pm 0,8$  pg/ml) son significativamente inferiores a los obtenidos en los otros grupos y similares a los hallados por otros autores utilizando cateterismo crónico.

**Bibliografía**

1. Baylis, P. H. y Heat, D. A.: *Clin. Endocr.*, **7**, 91-102, 1977.
2. Beardwell, C. G., Geelen, G., Palmer, H. M., Roberts, D. y Salamonsen, L.: *J. Endocrinology*, **67**, 189-202, 1975.
3. Brennan, T. C., Shelton, R. L. y Robertson, G. L.: *Abs. Am. Fe. Clin. Res.*, **23**, 232A, 1975.
4. Brunner, D. B., Burnier, M. y Brunner, H. R.: *Am. J. Physiol.*, **244**, H259-H265, 1983.
5. Camps, J., Martínez-Vea, A., Pérez-Ayuso, R. M., Arroyo, V., Gaya, J. y Rivera-Fillat, F.: *Clin. Chem.*, **29**, 882-884, 1983.
6. Czernichow, P., Merkelbach, U. y Vallotton, M. B.: *Acta Endocr.*, **80**, 444-452, 1975.
7. Edwards, C. R. W.: En «Hormones in Blood» (C. H. Gray y V. H. T. James, eds.), Academic Press, Londres, 1979, p. 423-450.
8. Kazim Hussain, M., Fernando, N., Shapiro, M., Kagan, A. y Glick, S. M.: *Clin. Metab.*, **37**, 616-625, 1973.
9. Kazim Hussain, M., Manger, W. M., Rock, T. W., Weiss, R. J. y Frantz, A. G.: *Endocrinology*, **104**, 641-644, 1979.
10. Keil, L. y Severe, W. B.: *Endocrinology*, **100**, 30-38, 1977.
11. Martini, L.: En «The Pituitary Gland» (G. W. Harris y B. T. Donovan, eds.), University of California Press, Los Angeles, 1966, Vol. 3, pp. 535-554.
12. Robertson, G. L., Mahr, E. E., Athar, S. y Sinha, T.: *J. Clin. Invest.*, **52**, 2340-2352, 1973.
13. Schrier, R. W.: *The Kidney*, **7**, 1-6, 1974.
14. Schrier, R. W., Berl, T. y Anderson, R. J.: *Am. J. Physiol.*, **236**, 321-332, 1979.
15. Shirahata, M., Okada, Y. y Ninomiya, I.: *Jap. J. Physiol.*, **33**, 391-401, 1983.

