

Influencia del método de extracción sanguínea sobre los niveles plasmáticos de renina en ratas Wistar*

W. Jiménez **, A. Martínez-Pardo, V. Arroyo, C. López, A. Rímola, J. Gaya y F. Rivera

Unidad de Hepatología y Laboratorio de Hormonas
Hospital Clínico y Provincial
Facultad de Medicina
08036 Barcelona (España)

(Recibido el 21 de noviembre de 1984)

W. JIMENEZ, A. MARTINEZ-PARDO, V. ARROYO, C. LOPEZ, A. RIMOLA, J. GAYA and F. RIVERA. *Influence of Blood Extraction Method on the Plasma Renin Levels in Wistar Rats*. Rev. esp. Fisiol., 41, 299-304. 1985.

To investigate the influence of blood extraction conditions on the renin-angiotensin system in rats, plasma renin activity (PRA) and plasma renin concentration (PRC) were measured in blood samples obtained by different methods. PRA and PRC in samples obtained by chronic catheterization, cardiac puncture without anesthesia, and decapitation immediately following light ether anesthesia were not significantly different from those obtained by simple decapitation (control group). In contrast, PRA and PRC in samples obtained by cardiac puncture and cavernous sinus puncture after light ether anesthesia were significantly ($p < 0.01$) higher than those obtained in the control group. There was a significant direct relationship between PRA and PRC in all samples studied ($r = 0.87$, $p < 0.001$). The present results suggest that light ether anesthesia increases renin levels, except when blood samples are taken by decapitation, and that chronic catheterization and cardiac puncture are the choice blood extraction methods to evaluate the renin-angiotensin system in rats.

Key words: Plasma renin levels, Rats.

En los últimos años, el sistema renina-angiotensina (SRA) ha sido objeto de numerosas investigaciones debido al destacado papel que juega en el control de la tensión arterial. Estos estudios han sido

realizados tanto en el ser humano como en diversas especies animales y en una extensa variedad de condiciones experimentales. A este respecto es bien conocido que la metodología seguida en la toma de la muestra sanguínea da lugar a modificaciones importantes en el SRA, lo que puede producir errores en la interpretación de los resultados. Este hecho reviste particular importancia cuando el estudio se realiza en el animal de experimentación ya que es de uso común la utilización de anestésicos para facilitar la toma de la muestra, a pesar de haberse

* Durante su realización W. Jiménez fue becado por el «Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social» (82/410) y A. Martínez por la «Fundació Catalana per l'Estudi de les Malalties del Fetge».

** A quien debe dirigirse la correspondencia.

demostrado que anestésicos volátiles o inyectables producen elevaciones significativas de la actividad renina plasmática (PRA) y de la concentración plasmática de renina (PRC) (4). La obtención de la sangre aórtica mediante decapitación inmediata del animal posibilita valorar básicamente el SRA (5), pero este método tiene el inconveniente de no permitir comparar valores de un mismo individuo, lo que es de especial interés cuando se realizan estudios secuenciales.

En el presente trabajo se valora la PRA y PRC en ratas Wistar utilizando diversos métodos de extracción sanguínea y se comparan con los niveles obtenidos por decapitación con objeto de establecer una metódica que proporcione valores similares al estado basal y permita el muestreo repetido en un mismo individuo.

Material y Métodos

Se utilizaron 30 ratas Wistar macho de 250-300 g, instaladas en jaulas individuales, alimentadas con una dieta estándar que contenía 117 mEq de Na⁺/kg y con agua *ad libitum*. Tras dos semanas de permanencia en las jaulas se tomó una muestra sanguínea entre las 12 y las 14 horas según el siguiente procedimiento:

Grupo Control (n = 5): Se procedió a la decapitación de los animales y se tomó sangre aórtica del tronco.

Grupo I (n = 5): Las ratas fueron anestesiadas con éter. Se cateterizó la vena yugular externa con un catéter siliconado PE-50, el cual fue protegido convenientemente dejándose una longitud suficiente a fin de permitir que la toma de la muestra se realizara sin que el animal lo percibiese (1). A las 24 horas de implantado el catéter se extrajo 1 ml de sangre.

Grupo II (n = 5): Los animales fueron sujetados por el dorso, extrayéndose seguidamente una muestra (1 ml) sanguí-

nea por punción cardíaca con una aguja 25G. El tiempo total invertido en la toma de la muestra siempre fue inferior a 90 s.

Grupo III (n = 5): Los animales fueron ligeramente anestesiados con éter (45-60 s) procediéndose a continuación de la misma forma que en el grupo control.

Grupo IV (n = 5): Se procedió a una ligera anestesia con éter (45-60 s) y se obtuvo una muestra sanguínea de 1 ml por punción cardíaca utilizando una aguja 25G.

Grupo V (n = 5): Las ratas fueron anestesiadas igual que en el grupo IV. La extracción sanguínea (1 ml) se realizó por punción en el seno cavernoso utilizando pipeta Pasteur.

Las muestras de sangre son mantenidas a 4°C con Na-EDTA (0,3 M) como anticoagulante. Los tubos se centrifugan a 4°C y el plasma se conserva a -20°C hasta su determinación.

La PRA se determinó estimando la velocidad de formación de angiotensina I durante 1/2 hora a 37°C, pH 7,4, en condiciones de inhibir la conversión de angiotensina I. El medio de incubación consistió en 250 µl de plasma problema, 250 µl de tampón fosfato 0,06 M conteniendo Na-EDTA 0,01 M, pH 7,4, y 10 µl de fluoruro de fenil-metil sulfonilo (0,3 M). La reacción se detuvo por enfriamiento introduciendo las muestras en baño de hielo. La concentración de angiotensina I se valoró por RIA comercial (angiotensin I, Radioimmunoassay, CIS, Sorin Biomedica, Saluggia, Italy).

La PRC se determinó estimando la velocidad de formación de angiotensina I al incubar pequeñas cantidades de plasma problema en presencia de cantidades elevadas y constantes de plasma exento de renina, obtenido de ratas Wistar macho binefrectomizadas de 36 horas, en condiciones de inhibir la conversión de angiotensina I. El medio de incubación consistió en 50 µl de plasma problema, 450 µl de plasma exento de renina, 380 µl de tampón fosfato 0,06 M, conteniendo

Na-EDTA 0,01 M, pH 7,4, y 10 μ l de fluoruro de fenil-metil sulfonilo 0,3 M. Tras 1/2 hora de incubación a 37°C la reacción fue detenida por inmersión en frío (4°C). La concentración de la angiotensina I se determinó por el método arriba descrito.

Los resultados obtenidos se expresan en ng/ml \times h como media \pm ESM. La comparación entre grupos se realizó por el test de la T de Student para series con distribución paramétrica y por el test de Mann-Whitney para muestras no paramétricas. La correlación entre dos variables se evaluó por el análisis simple de la regresión lineal.

Resultados

No existieron diferencias significativas en la PRA (fig. 1) de los animales en los que la muestra fue obtenida por cateterismo ($3,07 \pm 0,80$), punción cardíaca sin anestesia ($4,95 \pm 0,87$) o decapitación con anestesia ($2,81 \pm 0,92$) con respecto al grupo de control ($2,91 \pm 0,68$). Se observaron valores significativamente superiores ($p < 0,01$) cuando las muestras se obtuvieron por punción cardíaca ($7,81 \pm 0,60$) o punción en el seno cavernoso ($7,60 \pm 0,97$) tras ligera anestesia con éter.

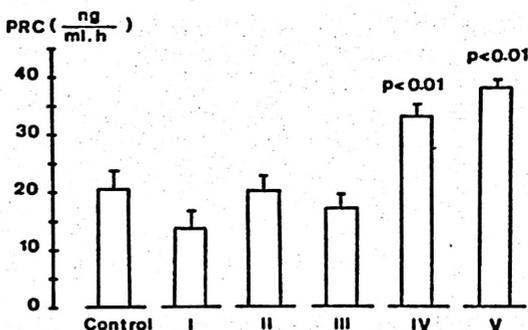


Fig. 2. Influencia del método de extracción sanguínea sobre la concentración plasmática de renina (PRC) en la rata. Grupos experimentales iguales que en la figura 1.

Los resultados de la PRC en los seis grupos de animales se representan en la

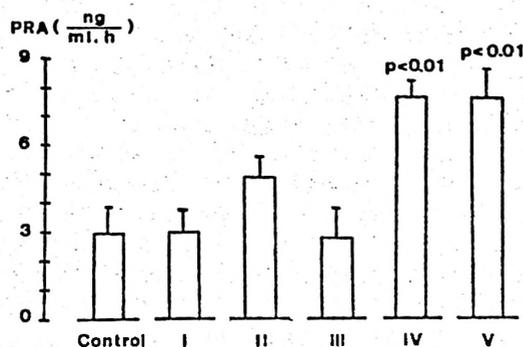


Fig. 1. Influencia del método de extracción sanguínea en la actividad de renina plasmática (PRA) en la rata.

Grupo control: decapitación; Grupo I: cateterismo; Grupo II: punción cardíaca; Grupo III: ligera anestesia con éter y decapitación; Grupo IV: ligera anestesia con éter y punción cardíaca; Grupo V: ligera anestesia con éter y punción en el seno cavernoso.

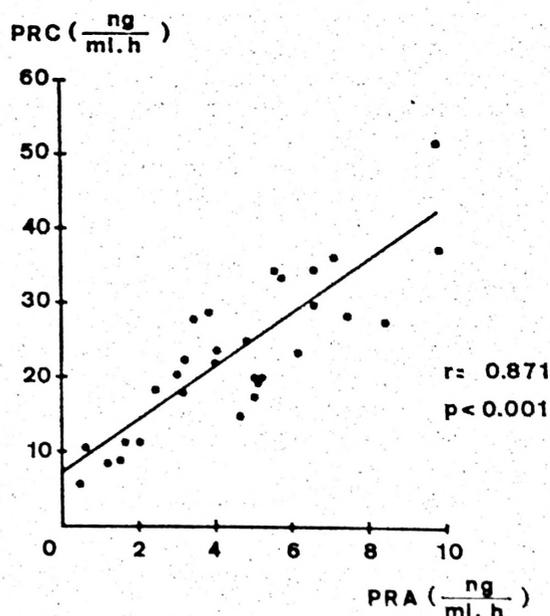


Fig. 3. Correlación entre los valores de PRA y PRC en las 30 muestras obtenidas.

figura 2. El patrón fue similar al de la PRA: no hubo diferencias entre los grupos I, II y III ($13,72 \pm 2,34$, $20,80 \pm 2,64$ y $17,03 \pm 2,72$, respectivamente) en relación al grupo control ($20,47 \pm 4,15$). Los valores de PRC obtenidos mediante decapitación sin anestesia (grupo control) fueron significativamente inferiores a los de los grupos IV ($33,93 \pm 2,69$) y V ($38,44 \pm 3,00$).

Hubo una correlación lineal altamente significativa entre los valores de PRA y PRC de los 30 animales estudiados (figura 3).

Discusión

Es bien conocido que las técnicas de obtención de la muestra sanguínea afectan de forma importante el SRA. En los estudios realizados en el animal de experimentación es común la utilización de anestésicos (éter, pentobarbital, uretano, etcétera) con objeto de facilitar la toma de la muestra aunque haya sido ampliamente demostrado que todos ellos modifican en diverso grado la PRA y PRC (2). A este respecto cabe indicar que se han realizado pocos esfuerzos para poner a punto técnicas que valoren el SRA en estado basal y que al mismo tiempo permitan realizar muestreos repetidos en un mismo animal.

Estudios previos han indicado que la decapitación inmediata permite obtener valores basales de PRA y PRC (3), por este motivo se seleccionó este procedimiento al establecer el grupo Control.

En los animales no anestesiados los valores de PRA y PRC fueron similares en las muestras obtenidas por decapitación, cateterismo o punción cardíaca y significativamente inferiores a las que se obtuvieron por punción cardíaca u ocular con ligera anestesia con éter.

El sistema de cateterización empleado posibilita la extracción sanguínea en ausencia de estrés, lo que permite valorar

el SRA en su estado basal. Sin embargo, este método presenta algunos inconvenientes: la estabulación de los animales es complicada, lo que dificulta la realización de estudios en los que intervenga un elevado número de individuos, y la frecuente obstrucción del catéter cuando se instala durante largo tiempo, aunque pueda evitarse con el uso de bombas de perfusión continua.

Según nuestros resultados, la punción cardíaca sin anestesia es el método de elección cuando deben efectuarse varias determinaciones en un mismo individuo, pues si bien los resultados obtenidos por este método fueron ligeramente superiores a los alcanzados mediante decapitación o cateterismo, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. En una larga serie estudiada en nuestro laboratorio la mortalidad producida por este procedimiento fue inferior al 3% (JIMÉNEZ, W., datos no publicados). Con objeto de minimizar la estimulación del SRA a causa del estrés es necesario realizar la extracción en un tiempo no superior a 90 s y debe descartarse la muestra cuando no se consigue en el primer intento.

La anestesia ligera con éter ha sido empleada como forma sencilla y rápida para la toma de muestras sanguíneas en la rata, considerando que las alteraciones que este método induce sobre el SRA son mínimas (7). Los resultados obtenidos demuestran que la anestesia ligera con éter estimula de forma significativa el SRA cuando la extracción se realiza por punción en el seno cavernoso o el corazón pero no cuando la muestra se obtiene por decapitación. Este hecho indica que la activación del SRA tras anestesia con éter no puede ser únicamente atribuido al anestésico *per se*. A este respecto, OATES y STOKES (3) observan resultados similares al estudiar la PRC en ratas anestesiadas con pentobarbital y en ratas no anestesiadas, comprobando que tras decapitación no existen diferencias

entre ambos grupos y, sin embargo, sí se producen cuando la muestra se obtiene por otro método utilizando el mismo anestésico. Nuestros resultados sugieren que la anestesia con éter puede predisponer a un estado de estimulación frente a pérdidas de volumen sanguíneo y que la decapitación es capaz de suprimir este estímulo.

No hubo diferencias en la PRA y PRC de los animales cuando fueron determinadas en sangre arterial o venosa. Esto puede apreciarse al comparar los valores de los grupos IV (sangre arterial obtenida por decapitación) y VI (sangre venosa obtenida por cateterización de la vena yugular externa), indicando que es indiferente la utilización de sangre arterial o venosa en la estimación del SRA en la rata.

En la rata, la concentración fisiológica de sustrato de renina es dos o tres veces inferior a la Km y, por tanto, la cinética es de primer orden con respecto al sustrato (6). Por esta razón, cuando se desea valorar el grado de activación del SRA mediante la velocidad de formación de angiotensina I es necesario controlar rigurosamente la influencia de la concentración de sustrato de renina. En las condiciones en las que se realizó este estudio existió una correlación altamente significativa entre la PRA (velocidad de formación de angiotensina I del plasma) y la PRC (velocidad de formación de angiotensina I del plasma en presencia de concentraciones saturantes de sustrato), indicando que ambos métodos son de utilidad en la determinación del SRA.

En conclusión, el presente trabajo describe diversas técnicas de extracción sanguínea, en ratas Wistar, y su efecto sobre la PRA y PRC, demostrándose que la cateterización crónica y la punción cardíaca sin anestesia, son los métodos de elección al permitir la valoración de los

niveles plasmáticos basales de renina y la toma de muestras repetidas en un mismo animal.

Resumen

Se determina la actividad renina plasmática (PRA) y la concentración plasmática de renina (PRC) en ratas, con objeto de investigar la influencia del método de extracción sanguínea sobre estos niveles. La PRA y PRC en las muestras obtenidas por cateterización, punción cardíaca sin anestesia y decapitación tras anestesia ligera con éter, no fueron significativamente diferentes de los obtenidos por decapitación (grupo control). Por el contrario, la PRA y PRC en las muestras obtenidas por punción cardíaca y punción en el seno cavernoso tras anestesia ligera con éter, fueron significativamente superiores ($p < 0,01$) que las del grupo control. Existió una relación lineal altamente significativa entre la PRA y PRC de todas las muestras estudiadas ($r = 0,87$, $p < 0,001$). Nuestros resultados sugieren que la anestesia ligera con éter incrementa los niveles de renina, excepto cuando la muestra se obtiene por decapitación; y que la cateterización crónica y la punción cardíaca sin anestesia son los métodos de elección para evaluar el sistema renina angiotensina en ratas.

Bibliografía

1. CHIUECH, C. C. y KOPIN, I. J.: *Am. J. Physiol.*, 234, H690-H695, 1978.
2. KEETON, T. K. y CAMPBELL, W. B.: *Pharmacol. Rev.*, 32, 81-227, 1980.
3. OATES, H. F. y STOKES, G. S.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1, 495-501, 1974.
4. PETTINGER, W. A.: *Anesthesiology*, 48, 393-396, 1978.
5. PETTINGER, W. A., TANAKA, K., KEATON, K., CAMPBELL, W. B. y BROOKS, S. N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148, 625-630, 1975.
6. POULSEN, K.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 27, 37-46, 1971.
7. RODRÍGUEZ-SARGENT, C., CANGIANO, J. L. y MARTÍNEZ-MALDONADO, M.: *Renal Physiol.*, 5, 53-56, 1982.

