

Un nuevo método espectrofluorimétrico para la determinación de la actividad de la renina renal: estudio comparativo con otros métodos

J. A. Narváez, E. Jiménez, A. Reyes, F. García-Sánchez * y M. Morell

Departamento de Bioquímica y Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga
Málaga

(Recibido el 26 de mayo de 1981)

J. A. NARVAEZ, E. JIMENEZ, A. REYES, F. GARCIA-SANCHEZ and M. MORELL. *A New Spectrofluorimetric Method for Renal Renin Activity: A Comparative Study with Other Methods.* Rev. es. Fisiol., 38, 143-148. 1982.

A new spectrofluorimetric method for protein estimation has been developed and applied to study the renin-angiotensin system. The fluorometric reagent, 1-4-diamino-2-3-dichloro-anthraquinone, is introduced in this field and used for the first time.

Renal semipurified rat renin is incubated with a synthetic substrate (N-acetyl-tetradecapeptide) at 0° C and 37° C, at optimal pH, during 3 hours. The incubated mixture is studied by bioassay (BA), radioimmunoassay (RIA) and spectrofluorimetric analysis (SFA), and values obtained with these methods are compared.

Blank samples for spectrofluorimetric analysis were prepared by substituting the incubated mixture with the unincubated components of the reaction. Its fluorescence values were subtracted from those of the incubated mixture.

Precision and sensitivity for RIA and SFA were similar in both cases, but different in the case of BA. Renal renin activity (RRA) values for RIA (7.15×10^{-3} nM/ml angio. I/3 h) and SFA (7.08×10^{-3} nM/ml angio. I/3 h) were statistically equal ($t = 1.05$; $p < 0.05$), while RRA values for BA (6.23×10^{-2} nM/ml angio. I/3 h), were higher and significantly different from the statistical point of view.

The graphical representation of RRA values for RIA versus SFA values gives an objective expression where $RRA_{(RIA)} = 0.78 RRA_{(SFA)} + 0.02$.

La importancia de las determinaciones de la concentración o actividad de renina en tejidos y líquidos biológicos, para el estudio del sistema Renina-Angiotensina,

hace que, día a día, se desarrollen métodos cada vez más precisos y sensibles.

El primer método desarrollado fue el Bioensayo (14), basado en la respuesta de tejidos u organismos vivos a la estimulación hormonal; más tarde se desarrollaron los métodos inmunológicos con la ayuda de hormonas marcadas radiactiva-

* Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Málaga (España).

mente, en especial el Radioinmunoanálisis (3, 18), método actualmente con mayor vigencia tanto en la clínica como en la investigación.

Posteriormente, se han desarrollado otros métodos, apenas utilizados rutinariamente y menos específicos, tales como la aplicación de la técnica de Lowry para proteínas, en la determinación de los productos generados en la reacción (10) o la determinación colorimétrica de dichos productos con ninhidrina (17). Por último, también se han desarrollado métodos espectrofluorimétricos con posibilidades de obtener datos fiables (5, 15, 16).

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos en la comparación del método Biológico y Radioinmunológico, frente a un nuevo método espectrofluorimétrico desarrollado en este laboratorio, en el que se utilizó por primera vez la 1-4-diamino-2-3-dicloro-antraquinona como fluoróforo para proteínas; habiendo estudiado de forma común, mediante estas tres técnicas, la actividad de la renina renal aislada de ratas.

Material y métodos

Se han utilizado riñones de ratas albino-wistar, adultas, de 250 g de peso, sin tratamiento alguno. Los riñones, una vez obtenidos, se maceran y se tratan según la técnica de HAAS *et al.* (6) para obtener una solución de renina semipurificada.

Esta solución de renina se puso a reaccionar con un sustrato sintético, N-acetil-tetradecapéptido (Bachem), en un medio tampón fosfato 0,2 M, pH 6. De esta preparación se extrajeron alícuotas, que se incubaron a 0° C unas, y a 37° C otras, ambas durante 3 horas. Las mismas muestras se analizaron mediante bioensayo, radioinmunoensayo y análisis espectrofluorimétrico; previamente se añadió a las muestras destinadas para los dos últimos análisis una solución etanólica de

2-3-dimercaptopropanol al 16%, como bloqueador.

Para el bioensayo se utilizaron ratas albino-wistar machos, adultas, de 200 g de peso, realizándose éste según la técnica descrita por NOBLE (13), haciendo simultáneamente la nefrectomía bilateral y el tratamiento con gangliopléjicos. Como registrador se utilizó un monitor quirúrgico de la casa SAN-EI, modelo 125, con transductor de presiones incorporado y registro gráfico de presión continuo.

Como patrón se utilizó la asp- β -amida de la Val⁵-angiotensina II (Hipertensina, Ciba). Se preparó una recta patrón inyectando cinco concentraciones diferentes de ésta, comprendidas entre $2,26 \times 10^{-2}$ y $3,74 \times 10^{-1}$ nM/ml disueltas en solución de Tyrode. Posteriormente se analizaron las soluciones problema. Para cada dosis se emplearon 5 animales, inyectando cada uno por duplicado.

Para la técnica del radioinmunoanálisis se utilizó el método del ligado competitivo, con un único anticuerpo según la técnica de HABER *et al.* (7). Se utilizó como registrador un espectrómetro contador de partículas gamma de la casa Packard, modelo 5130 con registrador.

Para el análisis espectrofluorimétrico se utilizó el siguiente método operatorio: en primer lugar, se preparó una recta patrón, utilizando como patrón el tetrapéptido Leu-Val-Tir-Ser (Bachem) a diferentes concentraciones, comprendidas entre 5×10^{-3} y $1,5 \times 10^{-1}$ nM/ml; a 0,1 ml de cada concentración se añaden 0,1 ml de una solución etanólica de 1-4-diamino-2-3-dicloro-antraquinona (K de K), purificada y preparada disolviendo 15 mg de la misma en 50 ml de etanol absoluto puro (Merck); 0,2 ml de tampón pH 5,5, 0,2 M, enrasando con agua destilada hasta un volumen total de 5 ml.

Tras la incubación de las muestras, se toman 0,1 ml de las mismas y se añade 0,1 ml de la solución etanólica de fluoróforo, 2 ml de tampón fosfato pH 5,5,

0,2 M y se enrasa con agua destilada hasta 5 ml.

Las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro de la casa Perkin-Elmer, modelo MFP-43A, equipado con lámpara de xenon como fuente de luz excitante, fotomultiplicador R-508, microfotómetro como unidad de medida, registrador gráfico Perkin-Elmer modelo 023 y cubetas de cuarzo fundido de 1×1 cm. La temperatura se mantuvo a $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$ mediante un ultratermostato Frigiterm.

Las muestras se midieron frente a un blanco preparado con 0,1 ml de la solución problema sin incubar, preparada justo en el momento del análisis, 0,1 ml de la solución de cromóforo, 2 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 5,5, enrasando con agua destilada hasta un volumen total de 5 ml.

Las condiciones fijadas en el aparato fueron 284 nm de longitud de onda de excitación, 340 nm de emisión, rendijas de 10 y 11 nm, respectivamente, y sensibilidad de 1/5. La temperatura de trabajo fue de $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

El aparato se calibró con una cubeta sólida de Rodamina-B, de concentración 10^{-7} M que, bajo las condiciones de 480 nm de longitud de onda para la excitación, 570 nm para la emisión, rendijas de 5 nm para ambas y sensibilidad de 10/7, dio una lectura del 75 % en intensidad relativa de fluorescencia. Otros detalles de esta técnica han sido descritos en otro lugar (12).

El estudio matemático del bioensayo se realizó según el diseño de análisis de rectas paralelas de cuatro puntos (2), aplicando el análisis de la varianza con el cálculo de la F de SNEDECOR (11). El RIA se estudió según los métodos convencionales, mediante el cálculo de la recta patrón y la lectura directa en la misma. De idéntica forma se realizó el estudio del análisis espectrofluorimétrico, dividiendo inicialmente entre dos los valores obtenidos a partir de la intensidad de fluorescencia.

La comparación de los análisis se realizó atendiendo al estudio de los criterios de seguridad: sensibilidad, calculada como la menor concentración diferente de cero capaz de ser determinada (2); exactitud, calculada por el método de KRAUSE *et al.* (9); precisión, calculada según el método de BROWN *et al.* (4).

Igualmente se calcularon los valores para la actividad de renina renal (ARR) obtenidos en cada análisis según el método de ALCÁZAR DE LA OSSA y RODRÍGUEZ (1).

Resultados

La recta patrón obtenida para el bioensayo presentó un coeficiente de regresión lineal (LR) de 0,98 ($p < 0,05$), con un índice de precisión (λ) de 0,16. Tras el análisis de la varianza se obtuvo un valor de 4,4 para la F experimental del contraste de regresión común, siendo las F experimentales para los contrastes de divergencia y diferencia entre preparaciones no significativas. El intervalo log-dosis fue de 0,52 y la potencia de 0,95 con intervalos entre 0,71 y 1,28. El valor de la pendiente fue de 28,85 con una angulación de 85° . El índice de precisión para el ensayo fue de 0,12.

La recta patrón para el radioinmunoensayo dio un coeficiente de regresión lineal (LR) de 0,99 ($p < 0,05$). Los mismos valores se obtuvieron para la recta patrón del análisis espectrofluorimétrico.

La sensibilidad obtenida para el bioensayo ha sido de $2,26 \times 10^{-3}$ nM/ml; mientras que para el radioinmunoensayo ha sido $1,58 \times 10^{-4}$ nM/ml, el valor obtenido para el análisis espectrofluorimétrico ha sido 5×10^{-3} nM/ml (tabla I).

La exactitud para el bioensayo ha sido del 52 %, mientras que el valor para el radioinmunoensayo ha sido del 100 %. No se ha calculado este parámetro para el análisis espectrofluorimétrico (tabla I).

Los valores de precisión obtenidos han sido $3,5 \times 10^{-2}$ para el bioensayo;

Tabla I. *Criterios de seguridad y valores de actividad de renina renal (ARR)*. Los valores de LR (Coeficiente de regresión lineal) son para $p < 0,05$. Los valores de sensibilidad y precisión se expresan en nM/ml. Los valores de ARR se expresan en nM/ml de angiotensina I/3 horas. n = número de casos.

	LR	Sensibilidad	Precisión	Exactitud %	ARR	n
Bioensayo	0,98	$2,26 \times 10^{-2}$	$3,50 \times 10^{-2}$	52	$6,32 \times 10^{-2}$	5
Radioinmunoensayo	0,99	$1,58 \times 10^{-4}$	$7,68 \times 10^{-2}$	100	$7,15 \times 10^{-3}$	8
A. espectrofluorimétrico	0,99	$5,00 \times 10^{-3}$	$2,81 \times 10^{-3}$		$7,08 \times 10^{-3}$	10

$7,65 \times 10^{-2}$ para el radioinmunoensayo y $2,81 \times 10^{-3}$ para el análisis espectrofluorimétrico (tabla I).

Los valores de actividad de renina renal (ARR) calculados para cada análisis han sido (tabla I) de $6,23 \times 10^{-2}$ nM/ml angiotensina I/3 h para el bioensayo; para el radioinmunoensayo $7,15 \times 10^{-3}$ nM/ml angiotensina I/3 h, y $7,08 \times 10^{-3}$ nM/ml angiotensina I/3 h para el análisis espectrofluorimétrico.

Discusión

El análisis de la varianza del ensayo biológico expresa la validez del mismo (2, 11). La F experimental del contraste de regresión común es muy significativa, lo que quiere decir que, tanto la recta patrón como la recta obtenida con las preparaciones desconocidas, tienen la misma pendiente; la ausencia de significación estadística del resto de los contrastes pone de manifiesto que ambas rectas son paralelas y contienen el mismo principio activo: la angiotensina II.

El valor del índice de precisión (λ) entra dentro del límite óptimo de aceptación (2).

Tanto la recta patrón del radioinmunoensayo como la del análisis espectrofluorimétrico presentan un coeficiente de regresión lineal de 0,99 ($p < 0,05$), lo que garantiza la lectura en ellas.

La sensibilidad obtenida para el bioensayo es menor que la obtenida para los otros métodos, tal como consta en la bi-

bliografía consultada (8), siendo mayor la obtenida para el radioinmunoensayo que la del análisis espectrofluorimétrico.

La exactitud del radioinmunoensayo es mayor frente a la del bioensayo; igualmente, el valor de precisión sigue siendo bajo para el bioensayo, mientras que para el análisis espectrofluorimétrico es mayor que el obtenido para el radioinmunoensayo.

Con estos valores para los criterios de seguridad se confirma que el bioensayo es un método de excepción en la determinación de la actividad de renina, dado sus bajos índices obtenidos frente al radioinmunoensayo y análisis espectrofluorimétrico, tal y como se confirma en la bibliografía (8), si bien sigue siendo un método útil cuando se utiliza como referencia en la investigación.

Por otro lado, conviene precisar que, mientras los métodos radioinmunológicos y espectrofluorimétricos son métodos *in vitro*, el método biológico es un método *in vivo*, lo que determina un mayor índice de error.

Como se observa en los criterios de seguridad, tanto el radioinmunoensayo (RIA) como el análisis espectrofluorimétrico (AEF), son equiparables. Esta comparación entre ambos métodos viene confirmada, además, por los valores obtenidos para la actividad de renina renal (ARR) para ambos (tabla I); la comparación entre los valores de cada método da una t de Student no significativa para una $p < 0,05$, con un coeficiente de re-

gresión lineal para ambos de 0,98 y una expresión objetiva tal que

$$ARR_{(RIA)} = 0,78 ARR_{(AEP)} + 0,02$$

Los altos valores para la ARR obtenidos para el bioensayo pueden ser explicados por haber utilizado la angiotensina II como patrón para este análisis.

Actualmente el radioinmunoensayo sigue presentando una gran ventaja frente a los métodos espectrofluorimétricos existentes, además del presentado aquí (5, 15, 16): la especificidad, dada por la propia naturaleza de la reacción inmunológica. No obstante, los buenos resultados obtenidos con este método confirman la calidad de los blancos preparados y abre nuevas perspectivas de futuro en el campo del fluoroinmunoensayo.

Por otra parte, si se consigue soslayar el problema de la especificidad, tema en el que se trabaja actualmente en este laboratorio, no parece existir obstáculo alguno para desarrollar un método completamente equiparable al radioinmunoensayo, que además presentaría la ventaja de su economía y rapidez, así como la de evitar el inconveniente de trabajar con isótopos radiactivos.

Resumen

Se ha desarrollado un método espectrofluorimétrico para la determinación de proteínas y se ha aplicado al estudio del sistema renina-angiotensina; el fluoróforo utilizado, la 1-4-diamino-2-3-dicloro-antraquinona, es la primera vez que se utiliza con este fin.

La renina renal semipurificada, procedente de rata, se puso a incubar con un substrato sintético (N-acetil-tetradecapéptido) a 0° C y a 37° C, durante 3 horas, en condiciones óptimas de pH. De esta solución se tomaron alícuotas, que se estudiaron mediante bioensayo, radioinmunoensayo y análisis espectrofluorimétrico, realizándose una comparación entre los métodos.

Para el análisis espectrofluorimétrico se prepararon blancos, en los que el producto de la

incubación se substituyó por los componentes de la reacción sin incubar; la fluorescencia emitida por estos blancos se restó a la emitida por las soluciones en estudio.

Los valores de sensibilidad y precisión obtenidos para el radioinmunoensayo y análisis espectrofluorimétrico son equiparables, no ocurriendo lo mismo para el bioensayo. Los valores de actividad de renina renal obtenidos para el radioinmunoensayo ($7,15 \times 10^{-3}$ nM/ml angio. I/3 h) y para el análisis espectrofluorimétrico ($7,08 \times 10^{-3}$ nM/ml angio. I/3 h) no difieren estadísticamente ($t = N.S.$; $p < 0,05$), mientras que el valor de ARR para el bioensayo ($6,23 \times 10^{-2}$ nM/ml angio. I/3 h) si difiere desde el punto de vista estadístico.

La comparación gráfica entre el radioinmunoensayo y análisis espectrofluorimétrico origina una expresión objetiva tal que $ARR_{(RIA)} = 0,78 ARR_{(AEP)} + 0,02$. Así, el método aquí desarrollado es útil para el estudio de este sistema, si bien se sigue estudiando a fin de mejorar los parámetros del análisis.

Se puede concluir que la incorporación de métodos no radioinmunológicos, como el método fluorimétrico que se compara en este estudio, está justificada al no existir diferencias significativas entre los valores obtenidos por radioinmunoensayo y los que se obtuvieron por el nuevo método espectrofluorimétrico.

Bibliografía

1. ALCÁZAR DE LA OSSA, J. M. y RODRÍGUEZ, F. J.: *Endocrinología*, 24, 83-90, 1977.
2. BORTH, R.: *Acta Endocr.*, 35, 454-468, 1960.
3. BOYD, G. W., ADAMSON, A. R., FITZ, A. E. y PEART, W. S.: *Lancet*, 48, 213-218, 1969.
4. BROWN, J. B., BULBROOK, R. P. y GREENWOOD, F. C.: *J. Endocrinol.*, 16, 41-48, 1957.
5. GALEN, F. X., DEVAUX, P., GROGG, P., MENARD, J. y CORVOL, P.: *Biochem. Biophys. Acta*, 523, 485-493, 1978.
6. HAAS, E., GOLDBLATT, H., GIPSON, E. G. y LEWIS, L.: *Circ. Res.*, 19, 739-749, 1966.
7. HABER, E., KOERNER, T., PAGE, L. B., KLIMAN, B. y PURNODE, A.: *J. Clin. Endocr.*, 29, 1349-1355, 1969.
8. HELMER, O. H.: En «Kidney Hormones» (Fisher, J., ed.). Academic Press, Londres, 1970, pp. 59-91.

9. KRAUSE, P. K., HUMMERICH, W. y POULSEN, K.: En «Radioimmunoassay of Renin-Angiotensin system». G. Thieme, Stuttgart, 1978.
10. LEVINE, M., DORER, F., KAHN, J. R., LENTZ, K. E. y SKEGGS, L. T.: *Anal. Biochem.*, **34**, 366-374, 1970.
11. MCARTHUR, J. M. y COLTON, T.: En «Statistics in Endocrinology». The Colonial Press. Inc., Nueva York, 1970.
12. NARVÁEZ, J. A.: Tesina de Licenciatura. Facultad de Medicina. Málaga, 1980.
13. NOBLE, A.: En «Experiments in Physiology and Biochemistry». Vol. 6 (Kerkut, G. A., ed.). Academic Press, Londres, 1973, pp. 1-32.
14. PICKENS, P. T., BUMPUS, F. M., LLOYD, A. M., SMEBY, R. R. y PAGE, I. H.: *Circ. Res.*, **27**, 438-448, 1965.
15. REINHARZ, A. y ROTH, M.: *Eur. J. Biochem.*, **7**, 334-339, 1969.
16. ROTH, M. y REINHARZ, A.: *Helv. Chim. Acta*, **49**, 1903-1907, 1966.
17. SKEGGS, L. T., LENTZ, K. E., KAHN, J. R. y HOCHSTASSER, H.: *J. Exp. Med.*, **128**, 13-24, 1968.
18. VALLOTON, M. B., PAGE, L. y HABER, E.: *Nature*, **215**, 714-715, 1967.