

Estudio cinético de la reacción enzimática renina-angiotensinógeno en plasma de rata

J. E. Campillo, T. Quesada, E. Sánchez-Cantalejo, J. Osorio y C. Osorio

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
Granada (España)

(Recibido el 21 de julio de 1975)

J. E. CAMPILLO, T. QUESADA, E. SANCHEZ-CANTALEJO, J. OSORIO and C. OSORIO.
Kinetics of Renin Reaction in Rat Plasma. Rev. esp. Fisiol., 32, 33-36. 1976.

Important kinetic aspects of renin reaction were studied in order to evaluate the parameters that regulate the formation rate of angiotensin I. This rate decreased throughout the incubation period of normal rat plasma and it showed a linear increase when plasma was incubated with renin-substrate. When renin was added to normal rat plasma a plateau in the angiotensin I formation rate occurred after 4-6 hours.

When plasma samples containing increasing amounts of renin-substrate were incubated, the velocity of their reaction increased in proportion to the renin-substrate concentration.

Under these incubation conditions, the reaction between endogenous renin and renin-substrate in normal rat plasma, proved to be a first kinetic order with respect to the substrate.

Estudios recientes han demostrado que, para una completa evaluación del sistema enzimático renina-angiotensina, es necesaria la determinación simultánea de los tres parámetros que definen la reacción renina-angiotensinógeno: velocidad de reacción y concentraciones de enzima y sustrato (6, 7).

La velocidad de reacción se puede determinar en la actualidad de una forma directa, midiendo por radioinmunoanálisis la cantidad de angiotensina I generada durante la incubación de una muestra plasmática (1, 2, 5). Sin embargo, no es posible determinar las concentraciones de

renina y angiotensinógeno presentes en una muestra problema directamente por métodos fisicoquímicos e inmunológicos, por lo que su medida debe realizarse a través de la cuantificación de los efectos cinéticos observados durante el desarrollo de su reacción *in vitro* (7).

Con este fin, se han propuesto numerosos métodos para la medida de las concentraciones de renina y angiotensinógeno en plasma u otros líquidos biológicos (6, 7, 9). Estos métodos presentan acusadas diferencias en su realización así como en los resultados cinéticos obtenidos, motivados fundamentalmente por la variabilidad

de las condiciones experimentales en que se realizan y que introducen importantes modificaciones en el medio de reacción.

En el presente trabajo se estudian algunos de los factores relacionados con la cinética de la reacción enzimática renina-angiotensinógeno, con el fin de revisar los parámetros que definen la velocidad de formación de angiotensina I en plasma de rata.

Material y métodos

Recogida de las muestras e incubación. Se extraen 5 ml de sangre de aorta abdominal de ratas macho Wistar (150-250 g) con jeringas a 0° C conteniendo 0,08 ml de una solución de EDTA-Na₂ al 6 % en agua. Las muestras se conservan en baño de hielo hasta su centrifugación a 4° C. El plasma así obtenido se separa en cinco alícuotas de 0,5 ml a las que se añaden 0,02 µl de una solución acuosa de sulfato de 8-hidroxiquinoleína 0,34 M y 0,01 µl de una solución alcohólica de dimercapto-propanol (BAL) 0,8 M. El volumen resultante se diluye en una cantidad igual de tampón fosfato 0,1 M pH 6, obteniéndose un pH de 6,5 en el medio, óptimo para esta reacción enzimática (6). De las cinco alícuotas, una permanece a 4° C durante todo el proceso, el resto se incuba en estufa a 37° C durante 2, 4, 6 y 8 horas, al cabo de las cuales se extrae 0,1 ml del incubado correspondiente y se diluye con 3,9 ml de tampón tris acetato 0,1 M pH 7,4, conteniendo un 0,5 % de lisozima. Esta dilución se conserva a 0° C hasta la medida por radioinmunoanálisis, de la angiotensina I que contiene.

Obtención de renina. La renina se extrae de riñón de rata según la técnica de HASS *et al.* (3) y purificada por precipitación con sulfato amónico al 60 % de saturación y filtración del precipitado en Sephadex G-100 (4). La actividad de renina en las fracciones obtenidas se mide incubando alícuotas del filtrado con plas-

ma de rata y midiendo la angiotensina I generada en las mismas.

Obtención de sustrato de renina. Se utiliza plasma de rata nefrectomizada de 48 horas (6) dializado frente a tampón fosfato conteniendo EDTA-Na₂ (10) y posteriormente liofilizado. Esta preparación no presenta actividad de renina, medida como angiotensina I, cuando se incubaba durante 24 horas a 37° C.

Radioinmunoanálisis de angiotensina I. Se utiliza el método de HABER *et al.* (2). Antisuero obtenido en conejos frente a lleu-5-angiotensina I, lleu-5-angiotensina I marcada con I¹²⁵ con una actividad específica de 500 mC/mg, e lleu-5-angiotensina I, son cedidos por CEA-IRE-SORIN.

A tubos de vidrio siliconados y mantenidos en baño de hielo se añaden las siguientes soluciones: 50 µl de la muestra problema o una solución estándar de angiotensina I, 50 µl de solución trazadora, correspondiente a 25 pg de angiotensina I marcada y 50 µl de antisuero diluido hasta conseguir un B/F = 1. El volumen se completa hasta 1 ml con tampón tris acetato 0,1 N a pH 7,4 conteniendo 0,5 % de lisozima. Los tubos se agitan en vortex y se incuban 24 horas a 4° C.

La separación de la angiotensina I libre de la unida al anticuerpo se realiza por adsorción de la última en charcoal dextrano T-70 (0,1 ml de una suspensión al 3 % por tubo). Tras 10 minutos de reposo se centrifuga durante 5 minutos a 2.000 rpm. El sobrenadante se recoge midiéndose la radiactividad contenida.

La concentración de angiotensina I en las muestras se determina por referencia a una curva estándar preparada al efecto.

Medida de la velocidad inicial de reacción. Este parámetro se obtiene a partir de la angiotensina I generada a las cuatro horas de incubación de la muestra problema, tras restarle el valor basal. Dicha velocidad se expresa en ng/ml/h de angiotensina I generada.

Resultados

La figura 1 muestra la influencia del tiempo de reacción en la generación de angiotensina I. En ella se representan los valores medios con sus desviaciones estándar de angiotensina I generada, obtenidos durante la incubación de plasma normal de rata (a), plasma de rata al que se añaden 100 mg de plasma de rata nefrectomizada liofilizado (b) y plasma de rata al que se añaden 0,5 ml de la preparación de renina (c). En este último caso y dada la elevada velocidad de reacción que se obtienen, se expresan también los valores de angiotensina I generada a los 30 minutos y en la primera hora de incubación.

La figura 2 expresa el efecto del aumento de la concentración de substrato de renina en la velocidad inicial de reacción, cuando se incuba una misma muestra plasmática con 20, 40 y 80 mg del liofilizado de plasma de rata nefrectomizada. Al representar gráficamente los valores

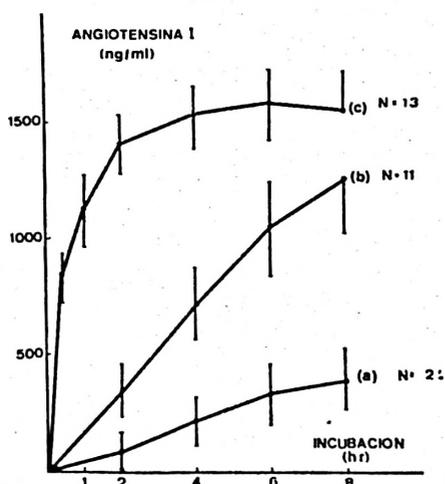


Fig. 1. Efecto del tiempo en la generación de angiotensina I, durante la incubación de plasma de rata normal (a), plasma de rata con substrato añadido (b) y con renina añadida (c.)

Las barras verticales representan la desviación estándar. N indica el número de plasmas estudiados en cada grupo.

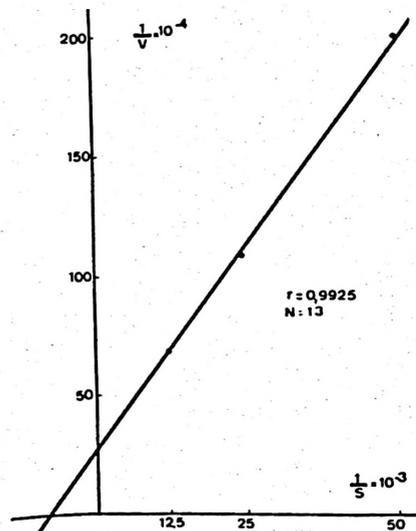


Fig. 2. Representación gráfica de Lineweaver-Burk que muestra el efecto del aumento de la concentración de substrato en la velocidad de reacción.

V es la velocidad de reacción y S la cantidad de substrato añadida a la muestra.

inversos de velocidad de reacción en ordenadas, frente a los correspondientes valores inversos de substrato añadido según el método de LINEWEAVER y BURK, se obtiene una línea recta.

Discusión

En la incubación de plasma normal de rata se observa que la generación de angiotensina I no es constante a lo largo del tiempo de incubación (fig. 1a). Este descenso en la velocidad de reacción puede deberse al agotamiento progresivo del substrato inicial, ya que al incubar la misma muestra plasmática a la que previamente se añaden 100 mg de la preparación de substrato descrita, la velocidad de reacción muestra un incremento lineal con respecto al tiempo por encima de seis horas de incubación (fig. 1b).

Por otra parte, cuando se incuba plasma de rata al que se añade 0,5 ml de la preparación de renina descrita con el fin

de obtener una elevada velocidad de reacción, se observa la aparición de un *plateau* en la generación de angiotensina I a partir de las 4-6 horas de incubación (fig. 1c).

Al estudiar el efecto del aumento de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción, se obtiene un incremento en la velocidad inicial, proporcional a la cantidad de sustrato añadido. Al representar los valores inversos de velocidad inicial de reacción frente a los correspondientes valores inversos de sustrato añadido, se obtiene una línea recta en todos los casos estudiados (fig. 2).

Estos resultados muestran que, bajo las condiciones de experimentación descritas y para las concentraciones de renina y sustrato presentes en un plasma normal, la reacción enzimática muestra una cinética de primer orden con respecto al sustrato, confirmando hallazgos previos realizados en diversas especies animales, incluido el hombre (6, 7, 8).

Este comportamiento cinético explica la necesidad de una determinación simultánea de las concentraciones de renina y sustrato para la evaluación del sistema renina-angiotensina, quedando reservada la medida de los niveles de renina en una muestra problema en función de la velocidad de reacción obtenida en la incubación de la misma (Actividad Plasmática de Renina o APR), en aquellas situaciones donde el hallazgo de una cinética de orden cero para esta reacción enzimática es habitual.

Resumen

Se estudian algunos de los aspectos principales relacionados con la cinética de la reacción enzimática renina-angiotensinógeno, con el fin de analizar los factores que definen la velocidad de formación de angiotensina I.

En la incubación de plasma normal de rata, la velocidad de formación de angiotensina I decrece a lo largo del tiempo de incubación. Sin embargo, al incubar una muestra plasmática con sustrato añadido, la velocidad de reacción muestra un incremento lineal con respecto al tiempo por encima de 6 horas. Cuando se incuba plasma de rata al que se añade previamente renina, se observa la aparición de un *plateau* en la generación de angiotensina I hacia las 4-6 horas de incubación.

Por otra parte, al incubar plasma de rata con cantidades crecientes de sustrato, se observa un incremento en la velocidad inicial de reacción proporcional a la cantidad de sustrato añadida.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas, la reacción entre renina y sustrato endógeno en plasma de rata normal muestra una cinética de primer orden con respecto al sustrato.

Bibliografía

1. FUKUCHI, S., TAKEUCHI, T. y TORIKAI, T.: *Clinical Science*, 44, 43, 1973.
2. HABER, E., HOERNER, T., PAGE, L. B., KLIMAN, B. y PURNODE, A.: *J. Clin. Endocrinol.*, 29, 1349, 1969.
3. HAAS, E., GOLDBLATT, H. y GIPSON, E. C.: *Arch. Biochem.*, 110, 534, 1965.
4. LUCAS, CH. P., FUKUCHI, S., CONN, J. W., BERLINGER, F. G., WALDHAUS, W. K., COHEN, E. L. y ROUNER, D. R.: *J. Lab. Clin. Med.*, 3, 689, 1970.
5. MALVANO, R., ZUCHELLI, G. C., ROSA, U. y SALVETTI, A.: *J. Nucl. Biol. Med.*, 16, 24, 1972.
6. MENARD, J. y CATT, K. J.: *Endocrinology*, 9, 422, 1972.
7. PULSEN, K.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 31, Supp., 132, 1973.
8. RYAN, J. W., MCKENZIE, J. K. y LEE, M. R.: *Biochem.*, 108, 679, 1968.
9. SEN, S., HIRASAWA, K., SMEBY, R. R. y BUMPUS, F. M.: *Amer. J. Physiol.*, 221, 1476, 1971.
10. SKINER, S. L.: *Cir. Res.*, 20, 391, 1967.