

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 086**

21 Número de solicitud: 202030312

51 Int. Cl.:

G01N 33/84 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

17.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.10.2020

Fecha de concesión:

26.03.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.04.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)
Avda. de Séneca, 2
28040 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**BENEDÍ GONZÁLEZ, Juana;
GARCIMARTÍN ÁLVAREZ, Alba;
MERINO MARTÍN, Jose Joaquín;
LÓPEZ-OLIVA, María Elvira;
MACHO GONZÁLEZ, Adrian y
GONZÁLEZ GONZÁLEZ, Pilar**

54 Título: **MÉTODO FLUORIMÉTRICO PARA LA VALORACIÓN DIRECTA DE NITRITOS/NITRATOS EN SUERO Y EN EXTRACTOS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS**

57 Resumen:

Método fluorimétrico para la valoración directa de nitritos/nitratos en suero y en extractos de tejidos biológicos.

La valoración de nitritos y nitratos tiene una demanda creciente en los laboratorios tanto de investigación básica como clínica. Algunos kits fluorimétricos comerciales presentan el gran inconveniente de que las muestras deben procesarse previamente para eliminar interferencias. La presente invención describe un método de valoración de nitritos/nitratos para un intervalo de concentraciones de 0 a 1200 pmoles de muestras biológicas de manera sencilla, directa y evitando el tratamiento previo de preparación de la muestra para eliminar posibles moléculas que interfieren en el resultado en otros métodos.

ES 2 785 086 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

MÉTODO FLUORIMÉTRICO PARA LA VALORACIÓN DIRECTA DE NITRITOS/NITRATOS EN SUERO Y EN EXTRACTOS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de medida de parámetros en suero y en tejidos biológicos en laboratorios. De forma más concreta, se refiere a un método de determinación de nitritos y nitratos siguiendo un método fluorimétrico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En Biomedicina existe un creciente interés en la medida de óxido nítrico (NO) en suero o plasma, ya que puede ser indicativa de varias enfermedades como psoriasis o enfermedades cardiovasculares, entre otras. La medida de NO también presenta interés en casos de isquemia debido a que niveles elevados de NO protegen frente a las secuelas inducidas por el ictus. Investigaciones sobre fisiopatología de enfermedades crónico-degenerativas muy prevalentes actualmente como la enfermedad del Alzheimer o el síndrome metabólico, indican que el NO parece jugar un importante papel en la inflamación de bajo grado presente en todas ellas. Por ello, el análisis de la concentración de NO en muestras biológicas puede ser una herramienta útil para conocer el grado de evolución de dichas patologías

25

La medida de óxido nítrico (NO) en muestras biológicas presenta la dificultad del corto periodo de la vida media de esta molécula (entre 6 y 10 segundos) que se transforma en nitritos y nitratos siendo los nitratos los más estables. Por ello, la valoración de nitritos y nitratos tiene una demanda creciente en los laboratorios tanto de investigación básica como clínica.

30

Existen varios métodos de valoración de nitritos que se basan en técnicas colorimétricas, fluorimétricas, HPLC y quimioluminiscencia. Dentro de ellos, destacan por su elevada sensibilidad, los métodos fluorimétricos que usan 2,3-

35

diaminonaftaleno (DAN). El método clásico es el desarrollado por Misko (Misko, T.P. et al. *A fluorimetric assay for the measurement of nitrite in biological samples*. Analytical Biochemistry (1993)214, 11-16). Existen empresas en el mercado que emplean una metodología similar a la de Misko (por ejemplo el kit de la empresa Abcam). Sin embargo, estos métodos tienen el inconveniente fundamental de la necesidad de realizar un procesamiento previo de la muestra que requiere de aparatos de elevado coste (como ultracentrifugas) o la adquisición de columnas comerciales que también encarecen la técnica.

10 Por todo lo anterior, existe la necesidad de un método sencillo y directo que evite el paso previo de preparación de la muestra.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

15 La presente invención describe un método fluorimétrico de valoración de nitritos/nitratos en muestras biológicas que se basa en el método clásico de Misko modificado. Las modificaciones introducidas permiten eliminar la necesidad de tratamiento previo de la muestra y rebaja el riesgo de toxicidad ocular y respiratoria del reactivo DAN.

20

El método comprende las siguientes etapas:

a) Preparar una disolución de 1mg/ml de 2,3-daminonaftaleno (DAN) en HCl 0,6M (a partir de aquí se llamará a esta disolución "DAN concentrado") y conservar en congelador.

25

b) En el momento de cada valoración, preparar una disolución tomando 10 µl de de la disolución anterior (DAN concentrado) y 190 µl de HCl 0,6M (a partir de aquí se haría referencia a esta disolución como "DAN diluido")

30

c) Obtener una curva de calibración de concentración de nitritos en un rango de 0 a 500 pmoles. (Tabla1). Este rango es suficiente aunque la curva de nitritos podría tener una sensibilidad hasta, al menos, 1200 pmoles.

d) Tomar un volumen entre 5 y 30 µl de suero o extracto de muestra biológica

35

e) Añadir agua destilada hasta un volumen total de 150 µl

- f) Adicionar 10 μ l de DAN diluido y mantener la mezcla 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad para permitir que se produzca la reacción entre los nitritos y el DAN.
- g) Adicionar 50 μ l de NaOH 3M y mantener, de nuevo, la mezcla 15 minutos en la oscuridad.
- h) Leer la fluorescencia a 340 nm exc. y 460 nm em. en un fluorímetro.
- i) Determinar la concentración de nitritos a partir de la fluorescencia leída y la curva de calibración de nitritos.
- j) Para la determinación de los nitratos es necesario un paso anterior a la técnica explicada, en el que los nitratos se pasan a nitritos por la enzima nitrato reductasa. Convertir los nitratos en nitritos y repetir las dos etapas anteriores para obtener la concentración de nitritos más los nitratos.
- k) Determinar la concentración de nitratos restando el valor de los nitritos.
- El método permite conocer la concentración de nitritos/nitratos para un intervalo de concentraciones de 0-1200 pmoles (Figura 1) sin necesidad de realizar un pretratamiento a la muestra para eliminar posibles moléculas que interfieren en el resultado en otros métodos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La Figura 1 muestra la sensibilidad de la curva patrón de nitritos en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

La Figura 2 muestra el efecto del volumen de suero sobre el resultado de la valoración fluorimétrica de nitritos

La Figura 3 muestra el perfil de elución del suero por paso de Sephadex G-25 Fine.

La Figura 4 muestra el efecto de la concentración de nitritos correspondiente a la mezcla de las fracciones 21 a 31 del paso de Sephadex G25 Fine que sería la equivalente a los metabolitos del suero.

5 REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

10 Ejemplo 1.

Este ejemplo se refiere a la preparación de la curva de calibración de nitritos.

Se prepara una disolución 5 μM de nitritos en agua destilada. De esta disolución se toman los μl indicados en la Tabla 1 ($\mu\text{l NaNO}_2$) para obtener un rango de concentraciones de nitrito entre 0 y 500 pmoles. Se añade agua destilada hasta 150 μl y después se añade un volumen fijo de DAN diluido de 10 μl . La Tabla 1 muestra las mezclas preparadas.

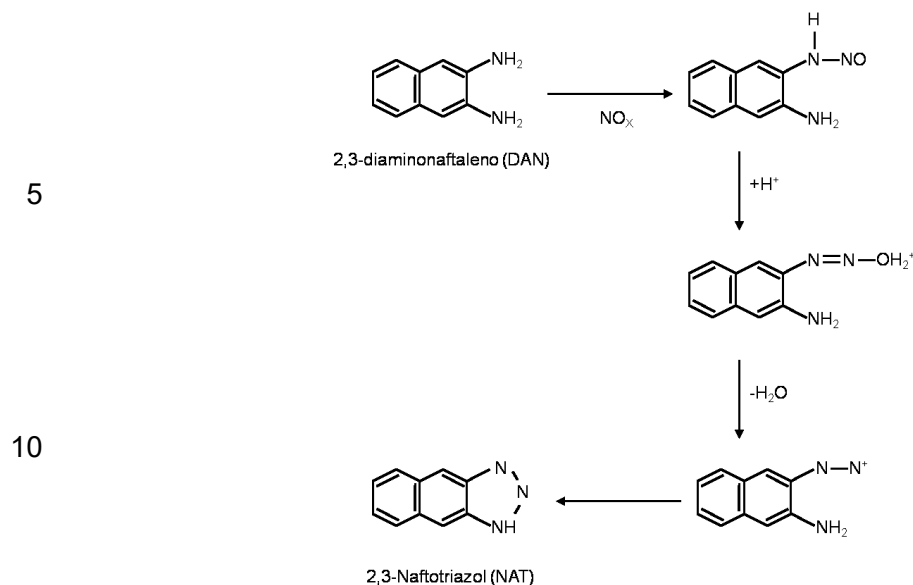
20

Tabla 1.

H ₂ O (μl)	NaNO ₂ (μl)	DAN diluido (μl)	pmoles (NaNO ₂)
150	0	10	0
130	20	10	100
110	40	10	200
100	50	10	250
90	60	10	300
80	70	10	350
70	80	10	400
60	90	10	450
55	95	10	475
53	97	10	485
50	100	10	500
130	Muestra =20	10	¿?

Cada mezcla preparada se mantiene durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, con el fin de permitir que se produzca la reacción entre los nitritos y el DAN:

25



15 Una vez transcurrido este tiempo se adicionan 50 μl de NaOH 3M y se deja otros 15 minutos en la oscuridad. Finalmente, se lee la fluorescencia a 340 nm exc y 460 nm em en un fluorímetro.

20 En la Figura 1 se representa el resultado obtenido con una curva patrón realizada con concentraciones de nitritos ente 0 y 1200 pmoles. Se aprecia cómo la concentración de nitritos es lineal hasta, al menos, 1200 pmoles de NaNO_2 como lo demuestra el coeficiente de correlación de la curva ($R = 0,9969$).

Ejemplo 2.

25

Este ejemplo se refiere a la influencia del grado de dilución del suero en la mezcla con agua, DAN y NaOH sobre la valoración de nitritos en suero. Se muestra cómo la reacción es lineal hasta los 30 μl de suero. Concentraciones superiores empiezan a tener interferencias.

30

Por lo tanto, para la valoración de nitritos en suero o en extracto de muestra biológica se pueden utilizar volúmenes diferentes de suero, entre 5 y 30 μl a los cuales se adiciona agua destilada (H_2O) hasta un volumen total de 150 μl . Se añaden 10 μl de DAN diluido y 50 μl de NaOH 3M del mismo modo que en el

35 ejemplo 1.

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos con diferentes volúmenes de suero. Se puede observar que la relación entre la concentración de nitritos y el volumen de suero en la mezcla es lineal en el intervalo de 5 a 30 µl de suero según la ecuación $Y = 54,6 X + 1,11$ ($R = 0,997$). Cantidades más altas de volumen de suero disminuyen la concentración de nitritos.

Esto indica que en el suero hay algún componente (proteína o metabolito) que a concentraciones altas (volumen de suero por encima de 40 µl en la mezcla) disminuye la fluorescencia de la reacción.

Ejemplo 3.

Con el fin de comprobar si son las proteínas las moléculas responsables de la interferencia observada cuando se emplea un volumen de suero mayor a 30 µL se mide el efecto de las proteínas sobre la fluorescencia.

Se determina el efecto de concentraciones de albúmina (alb) en el intervalo de 160 a 640 µg sobre una muestra de 100 pmoles de nitritos. En la tabla 2 se muestra el resultado de la fluorescencia en unidades arbitrarias (UAF) para varias concentraciones en este intervalo. Se indica también el error estándar de la media (SEM) y el valor de probabilidad (p) y se compara con el control (100 pmoles de nitritos).

25

Tabla 2.

Muestra	UAF		
	Media	SEM	p<
100 pmol NaNO ₂	900	9	(ns)
+160 µg Alb	830	39	(ns)
+ 320 µg Alb	873	13	(ns)
+ 480 µg Alb	868	8	(ns)
+ 640 µg Alb	862	10	(ns)

Estos resultados muestran que la presencia de albúmina, a concentraciones similares a las proteínas encontradas en el suero, no parece ser responsable de la pérdida de fluorescencia de la reacción de nitritos a concentraciones altas de suero.

30

Para reforzar este resultado se realiza una valoración de nitritos en suero desproteínizado por la precipitación con sulfato amónico $[\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2]$ y en suero pasado a través de columna de *Sephadex G25 fine* y se concluye de nuevo, que las proteínas no parecen ser responsables de la pérdida de fluorescencia a concentraciones altas de suero. Se detalla están estos resultados en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 4.

En este ejemplo se muestra la valoración de nitritos en suero desproteínizado con $[\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2]$

Se utiliza sulfato amónico para precipitar la mayoría de las proteínas presentes en el suero debido a su alta solubilidad y a la estabilización de las proteínas en este medio. Para ello se adicionan 100 mg de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a 250 μl de suero. Se agita y, posteriormente, se deja en reposo hasta completar la precipitación. A continuación, se centrifuga a 13000 rpm en *Eppendorff* durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante (suero sin proteínas) y se valoran los nitritos.

En la Tabla 3 se puede observar que en las muestras de suero a las que se ha eliminado la mayor parte de proteínas también disminuye la cantidad de nitritos a volúmenes de muestra más altos (muestras conteniendo suero, agua, DAN diluido y NaOH). Esto apoya la idea de que las proteínas no son responsables de la interferencia en la valoración de nitritos. Al valorar las concentraciones de sulfato de amonio en estas muestras, no se produce ningún efecto sobre la fluorescencia debida a nitritos.

Tabla 3.

Muestra (μl)	pmoles NaNO_2
5	38,9
10	68,9
20	118,9
30	88,1

Ejemplo 5.

Este ejemplo se refiere a la determinación de nitritos en suero pasado por una columna de *Sephadex G-25 fine*.

5

Se utiliza una columna de dimensiones 2 cm de alto 1 cm de diámetro, equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM pH=7,6. Se pasa un volumen de 200 µl de suero a través de la columna eluyendo con el tampón. Se recogen 96 fracciones de 3 gotas/fracción sobre placas Petri especiales para leer a 260-
10 280nm. Se lee el perfil de elución a 260 nm (detección de nucleótidos) y 280 nm (detección de proteínas) con el fin de detectar la fracción proteica y los metabolitos. Las moléculas de peso molecular (PM) más alto salen las primeras y, a continuación, se eluyen los metabolitos. Este perfil de elución se muestra en la Figura 3.

15

Las fracciones se unen del siguiente modo:

- Mezcla 1: fracciones 1 a 6
- Mezcla 2: fracciones 7 a 15 (moléculas de PM más alto, proteínas y ácidos nucleicos)
- 20 - Mezcla 3: fracciones 16 a 20
- Mezcla 4: fracciones 21 a 31 (metabolitos)
- Mezcla 5: fracciones 32 a 49

En la mezcla 4 (fracciones 21-31), correspondiente a metabolitos, se valoran los
25 nitritos mostrándose el resultado en la Figura 4, donde se observa que la medida de nitritos de la fracción que contenía solamente los metabolitos (mezcla 4) es lineal hasta la cantidad de 30 µl; fracciones mayores disminuyen la cantidad de nitritos, lo que significa menor fluorescencia de la muestra. Estos resultados indican que la molécula que disminuye la fluorescencia a volúmenes superiores
30 a 30 µL de suero es un metabolito y no una proteína.

Por otra parte, todos estos datos indican que el método de valoración de nitritos de la presente invención es válido para muestras de suero comprendidas entres
35 5 y 30 µl ya que en este intervalo no hay interferencias de proteínas ni metabolitos por lo que no es necesario eliminarlos previamente, lo que supone la

posibilidad de emplear el método de forma directa, sin el pre-procesamiento de la muestra que realizan el resto de métodos fluorimétricos disponibles en el mercado (ver Figura 2).

5 **Ejemplo 6.**

Este ejemplo muestra valoraciones realizadas en sueros de personas diabéticas.

En la Tabla 4 se presentan medidas realizadas con sueros control y muestras de
10 pacientes diabéticos y se observa que los enfermos diabéticos tienen mayor concentración de nitritos en suero.

Tabla 4.

Muestra	Media (mmoles/ml suero)	SEM	p<
Control	6,1	1,1	0,038
Diabéticos	13,2	1,6	

15 **Ejemplo 7.**

Este ejemplo muestra valoraciones realizadas en extractos de tejidos y células aisladas.

20 Se preparan extractos con tejidos de hígado, vejiga, células endoteliales y células polimononucleares (PMBC) usando 20mM de tampón Tris-HCl pH=7,6 en una proporción del 1/10 (100 mg de tejido por ml de tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,6).

25 Los resultados de la valoración de estos extractos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.

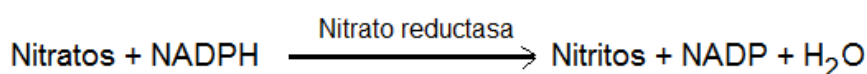
Muestra	Media
Extracto de hígado	53,6 ±3,7 pmol/g tejido
Extracto de vejiga	4,15±0,5 nmol/mg proteína
Células PMBC	247,6 ±46,7 pmol/ml
Medio de cultivo de células endoteliales	3,0 ±0,3 pmol/ml

Ejemplo 8.

Este ejemplo muestra la valoración de nitratos en suero y en extractos de muestras biológicas.

5

Para realizar la valoración de nitratos en primer lugar se pasan a nitritos, se valora la cantidad total de nitritos calculando después la diferencia. Para convertir los nitratos en nitritos se utiliza la enzima nitrato reductasa que cataliza la siguiente reacción:



10

Para realizar la valoración se mezclan 20 µl de suero con 5 µl de NADPH (2mg/ml), 23 µl de tampón Tris-HCl 20 mM pH = 7,6 y 2 µl de nitrato reductasa (20 mU), en un volumen total de 50 µl, y la mezcla se incuba a 37°C durante 15 minutos. Después se añaden 100 µl de agua, con lo que queda un volumen total de 150 µl y se procede a la valoración de los nitritos adicionando 10 µl de DAN diluido y 50 µl de NaOH. Se obtiene una curva patrón de la misma forma que se expone en el ejemplo 1 para el caso de los nitritos, pero adicionando a cada muestra NADPH (2mg/ml) y 23 µl de tampón Tris-HCl 20 mM pH = 7,6 para compensar la posible fluorescencia debida a al NDAPH y/o al tampón Tris-HCl.

15

La Tabla 6 muestra los datos de la curva patrón.

Tabla 6.

H ₂ O (µl)	NaNO ₂ (µl)	NADPH (µl)	Tris-HCl (µl)	DAN diluido (µl)	NaNO ₂ (pmoles)
122	0	5	23	10	0
102	20	5	23	10	100
82	40	5	23	10	200
72	50	5	23	10	250
62	60	5	23	10	300
52	70	5	23	10	350
42	80	5	23	10	400
32	90	5	23	10	450
27	95	5	23	10	475
25	97	5	23	10	485
22	100	5	23	10	500

Con esta curva de calibración se determinan los nitritos más nitratos (transformados en nitritos) de la muestra de suero o extracto biológico (nitritos

25

totales). El valor de nitratos, se obtendría restando el resultado de la valoración de los nitritos libres que se hace simultáneamente como se indicó en la sección de valoración de nitritos.

REIVINDICACIONES

1. Método fluorimétrico para la valoración directa de nitritos/nitratos en suero y en extractos de tejidos biológicos, caracterizado porque no requiere tratamiento previo para eliminar proteínas o metabolitos y que comprende las siguientes etapas:
 - a) Preparar una disolución de 1mg/ml de 2,3-daminonaftaleno (DAN) en HCl 0,6M y conservar en congelador.
 - b) En el momento de cada valoración, preparar una disolución tomando 10 µl de de la disolución anterior (DAN concentrado) y 190 µl de HCl 0,6M.
 - c) Obtener una curva de calibración de concentración de nitritos en un rango de 0 a 500 pmoles.
 - d) Tomar un volumen entre 5 y 30 µl de suero o extracto de muestra biológica
 - e) Añadir agua destilada hasta un volumen total de 150 µl
 - f) Adicionar 10 µl de DAN diluido y mantener la mezcla 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad para permitir que se produzca la reacción entre los nitritos y el DAN.
 - g) Adicionar 50 µl de NaOH 3M y mantener, de nuevo, la mezcla 15 minutos en la oscuridad.
 - h) Leer la fluorescencia a 340 nm exc y 460 nm en en un fluorímetro.
 - i) Determinar la concentración de nitritos a partir de la fluorescencia leída y la curva de calibración de nitritos.
 - j) Convertir los nitratos en nitritos y repetir las dos etapas anteriores para obtener la concentración de nitritos más los nitratos.
 - k) Determinar la concentración de nitratos restando el valor de los nitritos.
2. Método fluorimétrico para la valoración directa de nitritos/nitratos, según reivindicación 1, donde la concentración de nitritos/nitratos en la muestra de suero o extracto biológico está comprendida en el intervalo de 0 a 1200 pmoles.

3. Método fluorimétrico para la valoración directa de nitritos/nitratos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde el volumen de la muestra de suero o extracto de muestra biológica está comprendido entre 5 y 30 μ l.

5 4. Método fluorimétrico para la valoración directa de nitritos/nitratos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el extracto biológico procede de tejidos de hígado, vejiga o células endoteliales y polimorfonucleares.

10

15

20

25

30

35

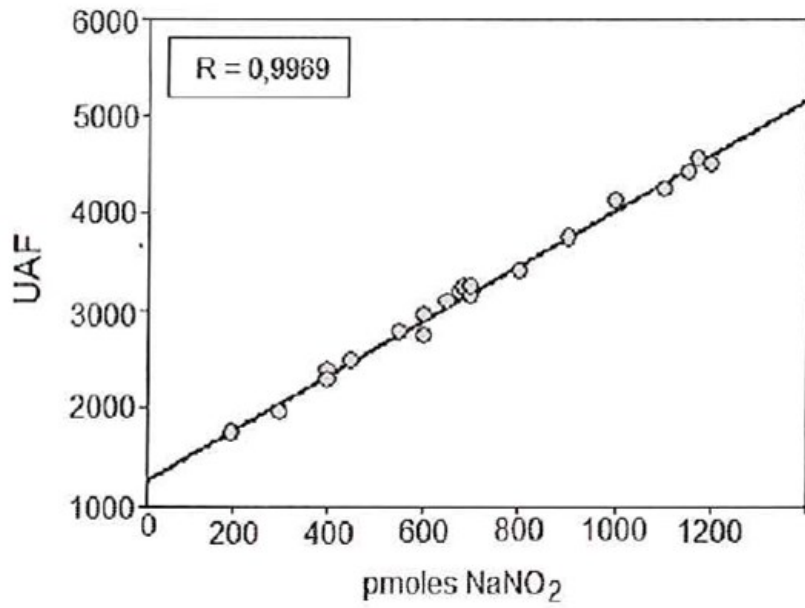


Figura 1

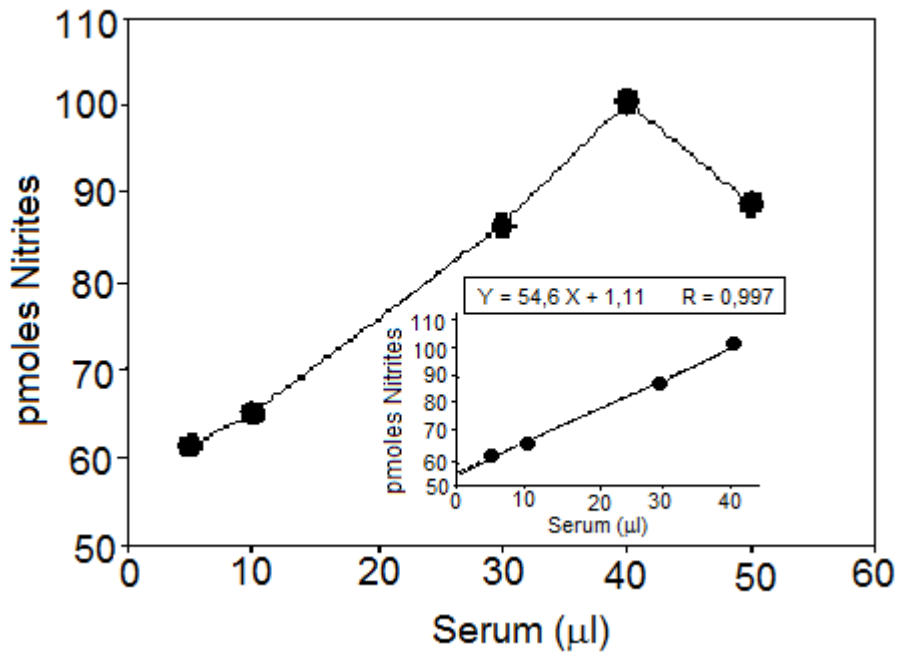


Figura 2

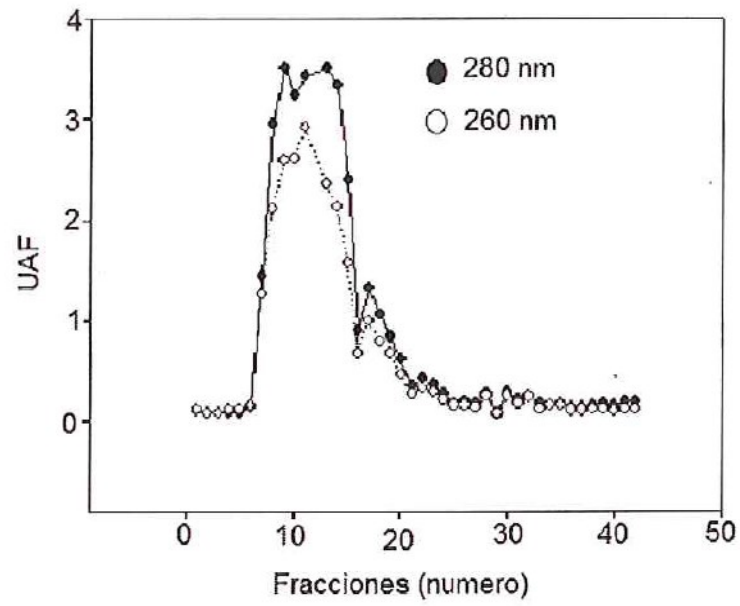


Figura 3

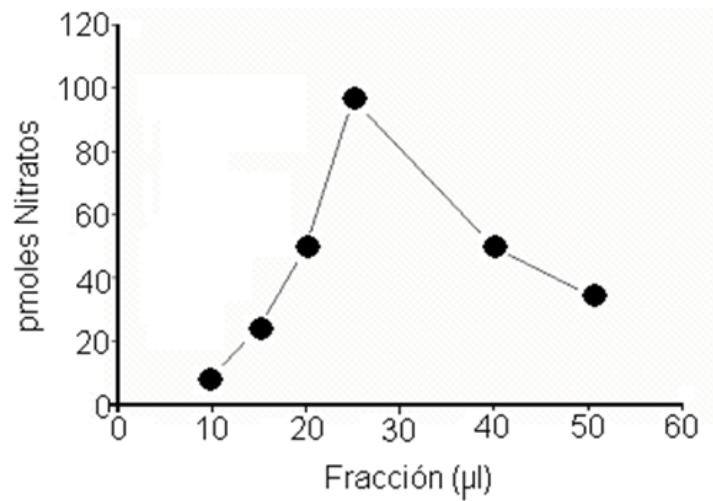


Figura 4