



Determinación de niveles de precursores del ácido úrico asociado al consumo de carnes rojas o procesadas: hipoxantina y xantina en sangre utilizando electroforesis capilar en zona

Determination of uric acid precursors associated to red and processed meats consumption: hipoxanthine and xanthine in blood by zone capilar electrophoresis

Valenzuela BM¹, LM Díaz-Tenorio¹, N López-Salinas¹, N Güemes-Vera² y J.F. Hernández-Chávez¹✉

¹*Departamento de Ciencias Veterinarias y Agronómicas del Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón Sonora, México.* ²*Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad km 1, Ex-Hacienda Aquetzalpa, Rancho Universitario C.P. 43600 Tulancingo, Hidalgo, México.* ✉ *Autor de correspondencia: juan.hernandez@itson.edu.mx*

Resumen

Debido a que el consumo de carnes rojas y procesadas está asociado a la hiperuricemia y gota, el análisis de precursores del ácido úrico es importante para la prevención de este tipo de enfermedades. La determinación clínica de ácido úrico en el diagnóstico de enfermedades renales y disfunciones articulares es un indicador de salud por su asociación con enfermedades metabólicas y cardíacas. Se desarrollo de una técnica para la determinación de los precursores del ácido úrico en fluidos corporales: hipoxantina y xantina por electroforesis capilar en zona libre. Se utilizó un capilar de sílice fundida recubierto de poliamida de (75 µm d.i. y longitud efectiva de 40 cm). La separación se realizó con una polaridad normal de 30 kv. Se utilizaron estándares de hipoxantina y xantina a 20 mM. Se utilizó una detección por UV a 200 nm de absorbancia. Los resultados obtenidos tiempos de migración de 5.3±0.13 min para hipoxantina y xantina de 5.6±0.33 min (n=5). Se concluye que la técnica de electroforesis capilar en zona libre para la determinación de AU y precursores, es más rápida, sensible y reproducible que otras metodologías reportadas en el área clínica de diagnostico considerando un ahorro de tiempo y reactivos.

Palabras clave: consumo carne, ácido úrico, precursores, electroforesis capilar en zona.

Abstract

Since red and processed meats consumption had been associated to hyperuricemia and gout, acid uric precursor's analysis is important to the prevention of this kind of diseases. Uric acid and articular dysfunction clinical determination is an indicator of health due to their association with metabolic and cardiac illness. A technique to determinate uric acid in corporal fluids: hipoxanthine and xanthine by capillary free zone electrophoresis. A melted silica capillary covered with polyamide (75 μm i.d. and effective length 40 cm) was employed. Separation was done with a 30 kv normal polarity. Hipoxanthine and xanthine standards were employed. UV detection at 200 nm was employed. Migration times obtained were 5.3 ± 0.13 min for hipoxanthine and 5.6 ± 0.33 min for xanthine (n=5). As conclusion, capillary free zone electrophoresis is a rapid, sensitive and reproducible methodology as compared with other reported in the clinical diagnostic, considering less time and reactives in the reported methodology.

Key words: Meat consumption, uric acid, precursors, capillary free zone electrophoresis.

Introduccion

El ácido úrico (2, 6, 8-trihidroxipurina) es el producto de catabolismo de los nucleósidos de purina. La mayor parte de ácido úrico (AU) es reabsorbida en el sistema circulatorio después de la filtración primaria y la secreción parcial por el riñón (Teijón, 2006). Los niveles de AU en fluidos fisiológicos tales como el plasma y la orina sirven como indicadores valiosos para ciertas condiciones clínicas como hipertensión, hiperuricemia entre otras (Zhao y col., 2008, Martínez y col., 2010). De Luis y col. (2010), señalan que la gota es el síndrome clínico producido por una alteración en el metabolismo del AU, que resulta del depósito de cristales de urato en las articulaciones, tejidos blandos y tracto urinario. La hiperuricemia es el resultado de un incremento en la producción de AU, una disminución en su excreción o una combinación de ambos mecanismos y es un factor de riesgo para el desarrollo de gota. La hiperuricemia, además de contribuir al desarrollo de la gota, ha adquirido una gran importancia como componente del llamado síndrome metabólico. Existen relaciones significativas entre la hiperuricemia y alteraciones como hiperinsulinemia, diabetes tipo 2, hipertensión, elevación de los triglicéridos, reducción de los niveles de HDL-c y obesidad de tipo central. La hiperuricemia parece ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad isquémica coronaria. Hoy en día se cuentan con métodos estandarizados para determinar AU (Walker y col., 1990), sin embargo, éstos no tienen la rapidez, exactitud y precisión que promete la electroforesis capilar en zona (ECZ).

La cuestión aquí es la asociación de estas enfermedades con el consumo de carnes. El consumo total de carnes (incluyendo como alimento principal o mezclas de: res, cerdo o cordero) carnes procesadas (salchichas, salami, tocino, hamburguesas) pollo o pavo, hígados, pescado (atún, camarones y langosta) y vegetales ricos en purinas (chicharos, frijoles, lentejas, espinacas, hongos y coliflor) está clínicamente asociado al incremento de

riesgo de gota hasta en un 21%. Este efecto es mayor en pacientes que ya tengan gota (Choi y col., 2004). Se recomienda reducir el consumo de este tipo de alimentos, en particular los de origen animal, para la prevención y manejo de la hiperuricemia y gota (Saag y Choi, 2006). Además, en individuos con problemas de masa corporal u obesidad el riesgo de gota esta también clínicamente asociado al consumo de carne (Choi y col., 2005). De este modo, la necesidad de desarrollar métodos con mayor potencial que desde el punto de vista médico serían útiles para las investigaciones fisiológicas, así como diagnóstico de enfermedades cardíacas y metabólicas.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología de determinación de niveles de AU y sus precursores (hipoxantina y xantina) utilizando la técnica de EC en zona libre.

Materiales Y Métodos

Los análisis de la presente se realizaron en el laboratorio de Calidad y Autenticidad de Alimentos de Origen animal del Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto Tecnológico de Sonora.

Muestreo: La toma de muestras sanguíneas se realizó en un diseño completamente al azar considerando a 40 alumnos del Programa Educativo de Ingeniero Biotecnólogo del ITSON. LA extracción de las muestras fue bajo el protocolo que maneja el Laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Ciencias Agronómicas y veterinarias.

VARIABLES a medir: Las variables que se consideraron para la determinación y cuantificación de AU y sus precursores en cuanto la reproductibilidad y exactitud de la técnica fueron: Tiempo de migración, área bajo la curva y altura del pico

Reactivos: Los estándares utilizados para la determinación de AU y sus precursores (xantina e hipoxantina), se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA), así como el ácido bórico y el tetraborato de sodio decahidratado utilizados en los buffer de corrida e hidróxido de sodio como buffer de acondicionamiento. Las soluciones fueron almacenadas a 4°C. Antes de utilizar las soluciones amortiguadoras fueron filtradas con vacío (bomba de vacío) utilizando membranas de acetatos de celulosa (0.45 µm) de Sigma (St. Louis, MO, USA). Las soluciones de trabajo de los estándares, fueron preparadas en agua en concentraciones individuales de 20 mM cada uno (trabajándose también en diluciones a concentraciones de 0.2 mM) y almacenadas a -20 °C hasta ser utilizadas. Para la realización de todas las soluciones se utilizó agua grado Milli Q.

Metodología

Para la purificación del suero sanguíneo se utilizó la metodología reportada por Zhao y col. (2008). Para la determinación de ácido úrico y sus precursores por electroforesis capilar en zona, su empleo la reportada por Liotta y col. (2009), modificando los parámetros de temperatura del capilar, voltaje y fuerza iónica del buffer.

Electroforesis capilar en zona: Para la determinación por electroforesis capilar se utilizó un equipo PACE-MDQ (Beckman Coulter Inc., Fullerton, Ca., USA) provisto de detector de

arreglo de diodos con luz ultravioleta. El análisis por Electroforesis Capilar se llevó a cabo utilizando un sistema de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.) equipado con detector de arreglo de diodo. Se utilizó el software 32 Karat Version 8.0 (Beckman Coulter). Se utilizó la modalidad electroforesis capilar en zona libre con capilares de sílice fundida sin recubrimiento interno (50 μm d.i., longitud total de 50 cm) con una longitud efectiva de 40 cm (longitud a la ventana de detección) (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.). Se utilizó detección por UV con un arreglo de diodos a 200 nm de longitud de onda y una polaridad normal. Se emplearon soluciones amortiguadoras a partir de ácido bórico y tetraborato de sodio (BORAX) (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones de 10 a 100 mM con rango de pH de 6 a 8, inyección de muestra a 5 de 10 s a 5 psi, voltaje de separación de 25 a 30 kv, con un rango de temperatura de 30 a 35°C para los tres analitos.

Columnas capilares: Para los estudios iniciales de optimización de las condiciones de separación de los estándares de AU, hipoxantina y xantina por ECZ, se utilizaron capilares no recubiertos con diámetro interno de 75 μm y varias longitudes (Beckman Coulter Instruments).

Para Optimización de las condiciones de separación en capilares no recubiertos, se utilizó uno de 50 cm de longitud total, 40 cm de longitud efectiva y 50 μm de d.i. El acondicionamiento previo se realizó mediante lavados de 30 min con 0.1 N de HCl. Se tomaron las condiciones establecidas por Hernández (2006), con algunas modificaciones de pH y temperaturas. Para el preacondicionamiento previo del capilar para la primera corrida, se utilizó la metodología reportada por Hernández-Chávez y col. (2011). Al final del día, el capilar se lavaba con agua desionizada durante 10 minutos, quedando lleno de agua hasta la siguiente aplicación.

Los resultados obtenidos para estandarización de la técnica de ECZ con relación a la reproducibilidad, se analizaron utilizando estadísticas descriptivas considerando media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada analito.

Resultados Y Discusiones

Para la realización de la estandarización de la técnica de ECZ, se utilizaron muestras de suero sanguíneo procedente de alumnos inscritos en los programas educativos de Médico Veterinario Zootecnista e Ingeniero Biotecnólogo del Instituto Tecnológico de Sonora. Previo a la extracción de sangre, se hicieron las corridas electroforéticas para determinar los estándares de los precursores de AU: hipoxantina y xantina a una concentración de 0.2 y 20 mM. Al ser moléculas muy similares en su estructura química, inicialmente se consideró tomar solo la determinación de AU para estandarizar la técnica de ECZ. Se utilizaron dos metodologías considerando buffer de boratos, partiendo de ácido bórico (75 mM) y tetraborato de sodio (20 mM) de 6 a 7 pH, inyección de muestra a 5 psi por 5 segundos con un voltaje de separación de 25 y 30 kv, con una temperatura de 35 a 35 °C. La selección del buffer está en función a la fuerza iónica necesaria para la continuidad

eléctrica. Las concentraciones generalmente del buffer intermediario se extienden a partir de 10 a 100 mM aunque hay muchas excepciones. Los buffer diluidos proporcionan separaciones más rápidas pero se reduce la cantidad de la muestra (López, 2009). Por lo que al modificar la concentración del buffer buscamos reducir el tiempo de análisis para que sea más rápida la determinación de dichos analitos, así como estabilizar el área bajo la curva de los picos de interés.

En la Figura 1, se muestra el electroferograma del estándar de hipoxantina donde se aprecia un pico bien definido y de buen altura con un tiempo de migración de 5.5 minutos. Estos resultados fueron obtenidos con el buffer de tetraborato de sodio a una concentración de 10 mM. Estas condiciones que muestra la Figura 1, son las que mostraron mejor reproducibilidad en tiempo de migración, área y altura de los picos. Además evidenciaban una adecuada línea base y corriente pureza en los análisis. Esto se demuestra la obtener una figura tridimensional de la corrida electroforética (Figura 2).

En la figura 3 se observa el electroferograma del estándar de xantina, con adecuada resolución del área y altura del pico, con un tiempo de migración de 5.5 minutos. Tiempo muy similar al obtenido por la hipoxantina (Figuras 1 y 2). Estas separación de tiempo puede ser llevada a cabo en un análisis simultaneo de ambos analitos (hipoxantina y xantina), utilizando le técnica de ECZ. En la figura 4 se observa la figura tridimensional del estándar de xantina.

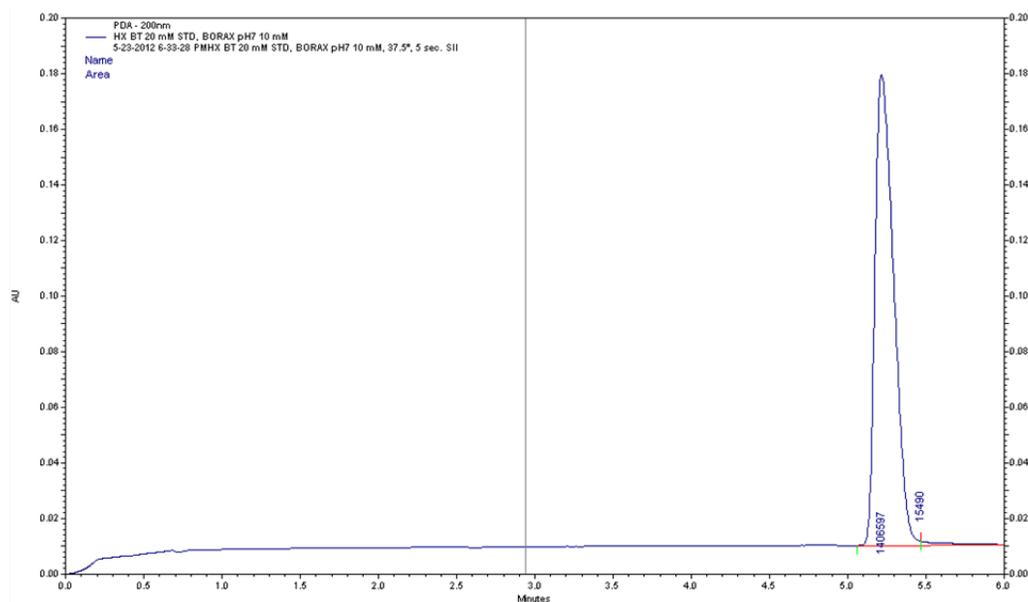


Figura 1. Electroferograma típico mostrando el estándar de hipoxantina utilizando la técnica de ECZ. Capilar de sílice fundida de 50 μm d.i., 40 cm de longitud efectiva, buffer de tetraborato de sodio 10 mM pH 7, inyección de 5 segundos a 0.5 psi, voltaje de separación de 30 kv a 37.5 $^{\circ}\text{C}$, muestra de suero 20 mM).

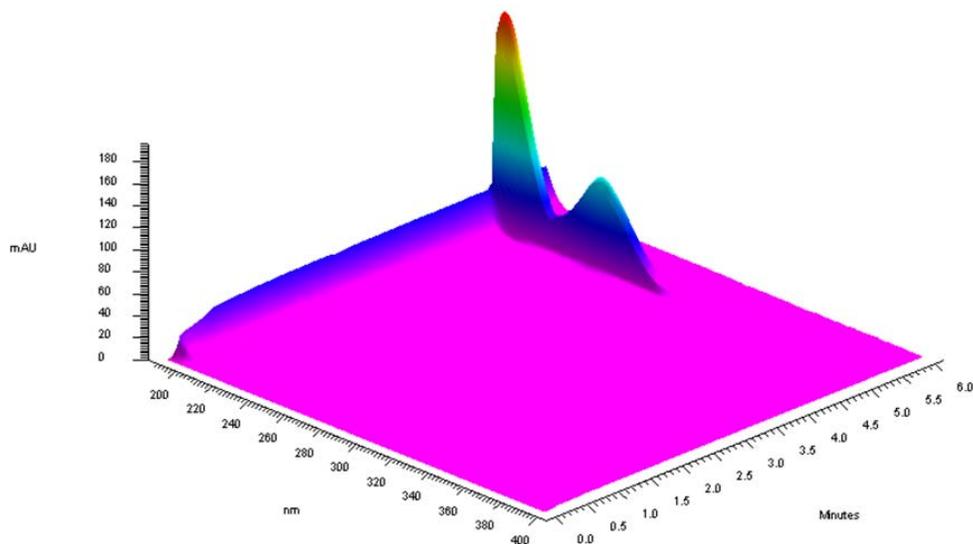


Figura 2. Electroferograma en tercera dimensión mostrando el estándar de hipoxantina utilizando la técnica de ECZ. Capilar de sílice fundida de 50 μm d.i., 40 cm de longitud efectiva, buffer de tetraborato de sodio 10 mM pH 7, inyección de 5 segundos a 0.5 psi, voltaje de separación de 30 kv a 37.5 $^{\circ}\text{C}$, muestra de suero 20 mM).

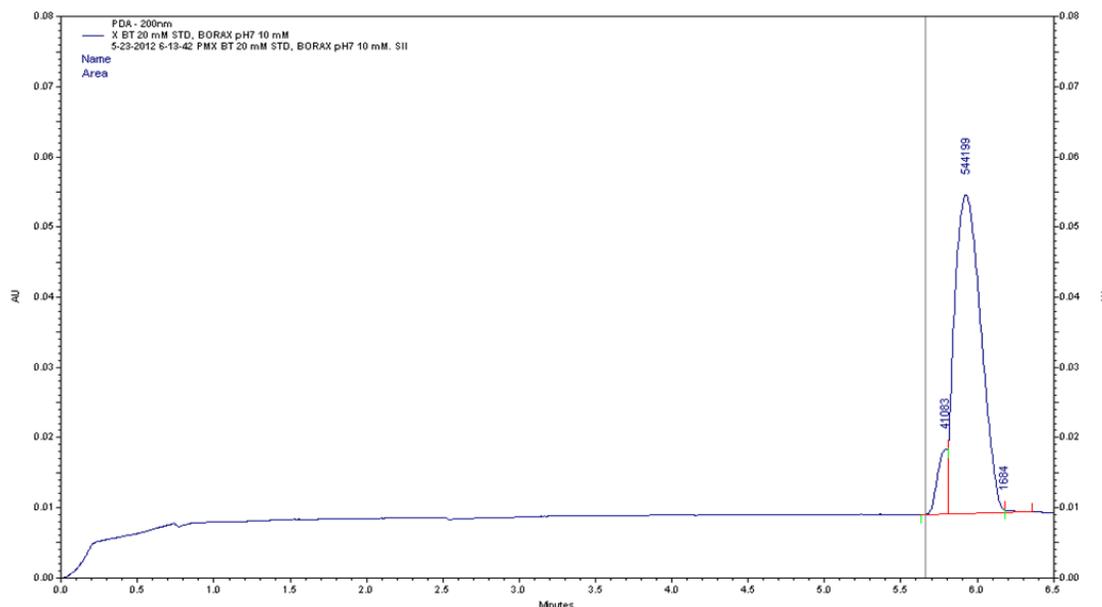


Figura 3. Electroferograma típico mostrando el estándar de xantina utilizando la técnica de ECZ. Capilar de sílice fundida de 50 μm d.i., 40 cm de longitud efectiva, buffer de tetraborato de sodio 10 mM pH 7, inyección de 5 segundos a 0.5 psi, voltaje de separación de 30 kv a 37.5 $^{\circ}\text{C}$, muestra de suero 20 mM).

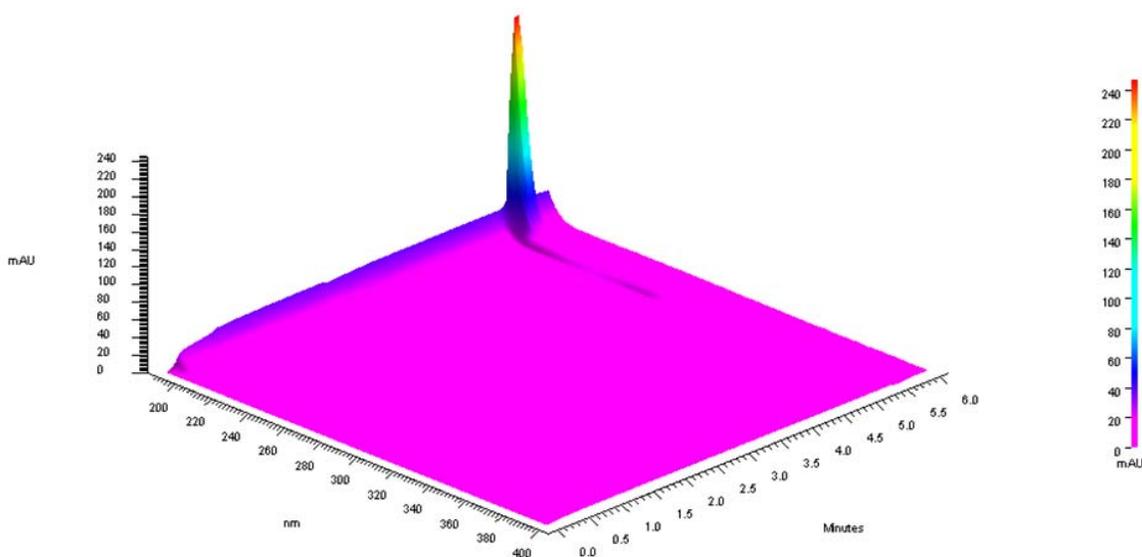


Figura 4. Electroferograma en tercera dimensión mostrando el estándar de xantina utilizando la técnica de ECZ. Capilar de sílice fundida de 50 μm d.i., 40 cm de longitud efectiva, buffer de tetraborato de sodio 10 mM pH 7, inyección de 5 segundos a 0.5 psi, voltaje de separación de 30 kv a 37.5 $^{\circ}\text{C}$, muestra de suero 20 mM).

Una vez establecidas las condiciones para la determinación de los analitos (hipoxantina y xantina), se procedió a determinar la reproducibilidad del método, el cual es un parámetro fundamental para comprobar la viabilidad de este tipo de metodologías que emplea CGZ en los que se utilizan capilares no recubiertos. En la Tabla 1 se muestran los valores correspondientes a promedios, desviación estándar y coeficientes de variación del tiempo de migración, área de los picos y altura del pico obtenidos para el mismo día y el mismo capilar para los diferentes analitos. Como se puede observar, se obtuvo una buena reproducibilidad en todos los casos, con coeficientes de variación de hasta 2.54 y 5.80% para los tiempos de migración (hipoxantina y xantina, respectivamente), para el área corregida de los picos fue de 4.02 y 2.43% (hipoxantina y xantina, respectivamente) y para la altura 4.26 y 2.00% (hipoxantina y xantina, respectivamente). La variación de las áreas y altura de los picos, se explica con la diferencia entre los pesos moleculares de los analitos, donde se observa una mayor concentración promedio en hipoxantina (1 447,854.00).

Los resultados anteriores demostraron que el método de separación propuesto es reproducible y eficaz, y en consecuencia, puede ser utilizado con confianza para el análisis de la determinación de los analitos propuestos en este trabajo.

Tabla 1. Valores estadísticos correspondientes a la metodología con el uso del buffer de boratos 10 mM de Iso precursores del AU por ECZ (n=5).

	Área (Au)			Tiempo			Altura		
	Media	Des Std	CV	Media	Des Std	CV	Media	Des Std	CV
Hipoxantina	1 447,854	58,346.21	4.03	5.312	0.1351	2.5423	164,541	7,016.62	4.26
Xantina	534,973	13,047.53	2.44	5.69	0.3302	5.8020	46,070	922.77	2.00

Considerando la estabilidad de la corriente, y la resolución adecuada de las áreas y picos de los tres analitos (AU, hipoxantina y xantina), con la metodología utilizando buffer de tetraborato de sodio, se procedió a analizar 5 muestras de los 38 sueros preparados procedentes de alumnos del Programa educativo de ingeniero Biotecnólogo de ITSON. El Figura 5, se observa un electroferograma en tercera dimensión en donde se aprecia picos cercanos a los establecidos por los dos analitos. Sin embargo no se alcanzan a definir los picos correspondientes a los estándares de hipoxantina y xantina, ya que se observa posiblemente presencia de proteínas de diverso peso molecular que contaminan el análisis. Es importante resaltar que las muestras de suero sanguíneas fueron congeladas previa a su secado según la metodología propuesta por Zhao y col. (2008). Este ruido evidente en las determinaciones de los analitos en las muestras problemas, pudo ser debido a una inadecuada extracción o secado de la muestra. La determinación de adecuada de estos precursores del AU en fluidos sanguíneos, es de suma importancia ya que estos están presentes, en grandes cantidades, en órganos internos tales como el hígado y riñón. Resultando de la oxidación de los mismos para determinar la concentración total del AU en la sangre y carne. Estos precursores sirven como sensibles indicadores de salud de ciertos estados patológicos como la gota, hiperuricemia, falla renal, toxemia durante la preñez, síndrome metabólico entre otras (Boughton y col., 2002; Kuman y Swetha, 2008). La determinación simultánea de estos componentes tiene una vital importancia en la calidad de los alimentos, diagnóstico clínico y bioquímico.

Conclusiones

La técnica de ECZ para la determinación de AU y precursores, es más rápida, precisa y reproducible que lo que reporta la literatura sobre otras metodologías para la determinación de indicadores de salud en el humano considerando el ahorro considerable de tiempo y reactivos, además es una técnica relativamente reciente y poco explotada en México, y tiene un gran potencial de aplicaciones. Su principal ventaja radica en el uso de pequeñas cantidades tanto de muestra como de solventes, esto, es importante desde el punto de vista económico y ecológico. La dificultad que presenta la técnica es la optimización de los parámetros de separación, sin embargo, una vez obtenidos tales parámetros, la aplicación del método de caracterización es fácil y rápida. En esta

protocolo se obtuvo que utilizar buffer de tetraborato de sodio a una concentración de 10 mM, se obtienen muy buenos resultados en cuanto a tiempo de migración y porcentaje de área de los analitos. Es un buffer estable. Falta estandarizar el protocolo de depuración de los sueros para tener extractos más limpios y una mejor determinación de estos analitos en muestras problemas

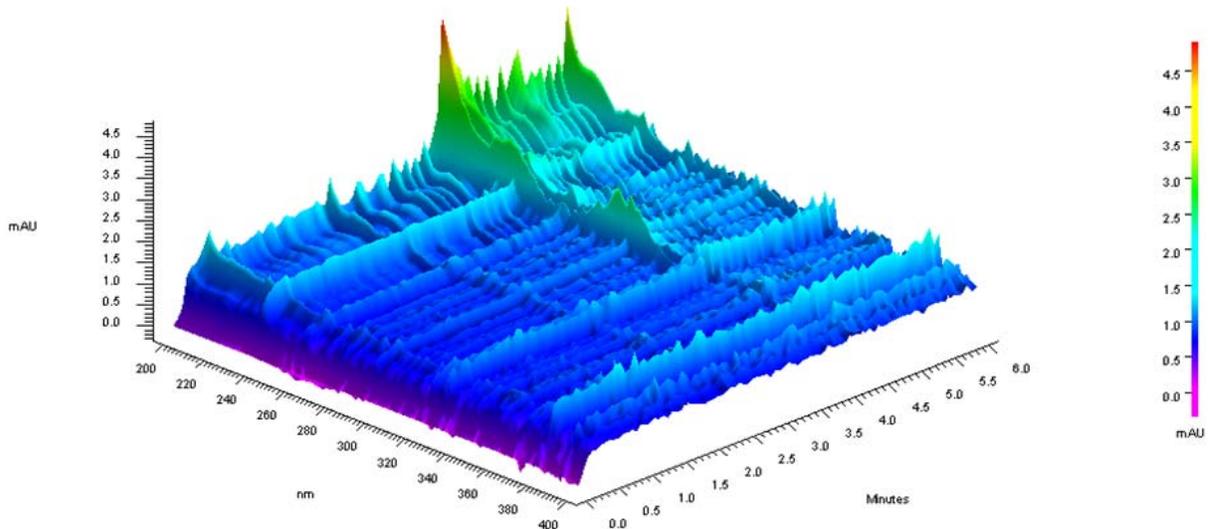


Figura 5. Electroferograma en tercera dimensión mostrando la determinación de precursores de AU: hipoxantina y xantina en muestras problemas. Capilar de sílice fundida de 50 μm d.i., 40 cm de longitud efectiva, buffer de tetraborato de sodio 10 mM pH 7, inyección de 5 segundos a 0.5 psi, voltaje de separación de 30 kv a 37.5 $^{\circ}\text{C}$, muestra de suero 20 mM.

Referencias

- BOUGHTON, J.L., ROBINSON, B.W. & STREIN, T.G. (2002). Determinación de ácido úrico en suero humano por electroforesis capilar con polaridad reversa y detección electroquímica. *Electrophoresis*. 23: 3705-3710.
- HK CHOI, K ATKINSON, EW KARLSON, W WILLETT, G CURHAN. 2004. Purine-rich foods, dairy and protein intake, and the risk of gout in men. *The New England Journal of Medicine* 350: 1093-103.
- SAAG KG, H CHOI. 2006. Epidemiology, risk factors, and lifestyle modifications for gout. *Arthritis Research & Therapy* 8 (Suppl. 1), S2. Disponible en <http://arthritis-research.com/content/8/S1/S2>.
- CHOI HK, K ATKINSON, EW KARLSON, G CURHAN. 2005. Obesity, Weight Change, Hypertension, Diuretic Use, and Risk of Gout in Men. *Archives of Internal Medicine* 165: 742-748.

- DE LUIS, D.A, BELLIDO, D. & GARCÍA P.P. (2010). Nefrolitiasis. Dietas controladas en purinas. En Dietoterapia, Nutrición Clínica y Metabolismo. MC Zapata, D Álvarez, P Serrano, J Ocón. (Editores). Ediciones Díaz de Santos, Madrid, pp. 381-388.
- HERNÁNDEZ-CHÁVEZ J.F. 2006. Identificación y cuantificación de especie en productos cárnicos procesados térmicamente mediante el uso combinado de electroforesis capilar y técnicas moleculares. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, México.
- HERNÁNDEZ-CHÁVEZ J.F., GONZÁLEZ-CÓRDOVA A.F., RODRÍGUEZ-RAMÍREZ R. Y B. VALLEJO-CORDOBA. 2011. Development of a polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis method for the detection of Chicken or turkey meat in heat-treated pork meat mixtures. *Analytica chimica Acta*. 708:146-154.
- KUMAR A. S. Y P. SWETHA. 2010. Ru(DMSO)₄Cl₂ nano-aggregated Nafion membrane modified electrode for simultaneous electrochemical detection of hypoxanthine, xanthine and uric acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 642: 135–142.
- LIOTTA, E., GOTTARDO, R., BONIZZATO, L., PASCALI, J.P., BERTASO, A. & TAGLIARO, F. (2009). Rápida y directa determinación de creatinina en orina usando electroforesis capilar. *Acta química clínica*. 409: 52-55.
- LÓPEZ-BERMÚDEZ F. 2009. Desarrollo de un nuevo método de electroforesis capilar de zona para el análisis de extractos de *Eysenhardtia polystachya*. Tesis de Licenciatura. Universidad del Istmo, México.
- MARTÍNEZ, S.M., PÉREZ, J.L., GARCÍA, M. & JIMÉNEZ, M.C. (2010). Valores séricos de proteínas totales, albúmina y ácido úrico en personal expuesto a las radiaciones electromagnéticas. *Revista Cubana de Medicina Militar* 39: 192-199.
- REYNA, E., TORRES, D., PEÑA, E., MEJIA, J., REYNA, N. & GONZÁLEZ, P. (2008). Ácido úrico como indicador pronóstico de severidad de la excreción urinaria de proteínas en 24 horas. *Gaceta Médica de Caracas* 116: 219-223.
- TEIJÓN, J.M. (2006). Fundamentos de bioquímica metabólica (2da. Ed.). Madrid España: Editorial Tébar.
- WALKER, K., HALL, D. & HURTS, W. (1990). *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Butterworth, Boston.
- ZHAO, S., WANG, J., YE, F. & LI, Y. (2008). Determinación de ácido úrico en orina humana y suero por electroforesis capilar con detector de quimioluminiscencia. *Bioquímica Analítica* 378: 127-131.