



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE COENZIMAS POR
ELECTROFORESIS CAPILAR.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO

PRESENTA
CORTES GINEZ MARIA DEL CARMEN

ASESORAS:

DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ
DRA. MARGARITA DIAZ FLORES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis

Desarrollo de un método analítico para la determinación de coenzimas por electroforesis capilar.

Que presenta la pasante: María del Carmen Cortés Ginez

Con número de cuenta: 411075486 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
SECRETARIO	Dra. María del Rosario Moya Hernández	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Martha Angélica Villegas González	
2do. SUPLENTE	Q. Karla Paola Hernández Pérez	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

DEDICATORIA

A mis cuatro amores, por supuesto.

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento es al universo, porque a pesar de ser infinito tuvo la gentileza de rodearme de personas únicas y maravillosas.

A mis padres por darme a dos hombres grandiosos como hermanos.

A mi madre por ser una guerrera incansable y por nunca darse por vencida, por cuidar de mí y por tenerme paciencia, por llenarme de amor y con ese amor de sobra curar mis enfermedades, celebrar mis logros e impulsarme a conseguir más.

A mi hermano Ramón por confiar en mí y dar lo mejor de sí siempre, por sacarme una sonrisa aunque todo lo demás impidiera sonreír, por guiarme, por consentirme, por protegerme y estar siempre presente, por no solo enseñarme a valerme por mi misma, si no por mostrarme que todo es posible si hay esfuerzo y dedicación, por escucharme, por sus consejos, por su cariño incondicional, por su gran corazón, por su gran sabiduría, por compartir su vida con nosotros y por ser un hombre honesto, inquebrantable, de palabra y sobre todo de hechos, por ser el héroe de mi vida y la persona que más admiraré siempre.

A mi hermano Miguel por compartir los momentos más difíciles, por acompañarme siempre, por su cariño y paciencia, por tener un pensamiento tan único, y por ser mi hermano, no podría ser mejor si fuese de otra manera.

A todas las personas que fueron apareciendo en el camino y hacer de este viaje una experiencia increíble, a mis amigas de vida Dulce y Marisol y a la que pudiera ser mi hermana si quisiera, Lourdes.

A mis compañeros y hermanos de universidad: Adrián, Alejandro, Brenda Elizabeth, Cinthya, Miguel, Karla, Sergio, Tere y Vanesa, no solo por compartir el mismo amor por la ciencia y la química, sino también por llenarme de grandiosas experiencias y enseñanzas.

A mi Alma Máter la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi hogar, regalarme estupendos amigos, excelentes maestros y darme los conocimientos necesarios para hacer lo que me gusta, por mostrarme que más allá del aprendizaje de una disciplina, para poder ser

AGRADECIMIENTOS

llamado Universitario, es imprescindible poseer valores, principios e incluso apreciación por el arte, tener empatía con las personas que te rodean, y dar lo mejor de ti a la sociedad.

A mis maestros de carrera, en especial a la Dra. Marina Morales, a la Dra. Guillermina Rivera, a la Dra. Gabriela Vargas, a la Dra. Graciela, a la profesora Angélica por su gran vocación y pasión para transmitir ciencia a través de la enseñanza.

A mi asesora de tesis, la Dra. Alma Revilla, por sus enseñanzas, paciencia, consejos y por brindarme la confianza para que siempre llegara más lejos.

A la Doctora Margarita Díaz Flores, por abrirme las puertas de su laboratorio, por guiarme y por despertar nuevos intereses en mi hacia la investigación, por su incondicional apoyo, confianza y paciencia, por ser una persona íntegra y gran ejemplo a seguir, por sus grandes valores, por todas sus atenciones y por todas las enseñanzas y grandes experiencias que adquirí día a día.

A todos mis compañeros y grandes amigos de La unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital Siglo XXI, principalmente a Saraí, Rubén, Martha, Osiris, David y Julio porque sin su apoyo, prácticamente esta tesis no estaría escrita, además por su valiosa amistad, consejos y apoyo, por las inolvidables experiencias y por hacerme sentir parte de su gran equipo de trabajo.

A todas y cada una de las personas que han llegado a cambiar mi vida con hermosas y malas vivencias, porque de cada una de ellas se aprende y se crece como persona.

ABREVIATURAS

NAD	Dinucleótido de Adenin Nicotinamida	DNA	Ácido desoxirribonucleico
NADP	Dinucleótido de Adenin Nicotinamida Fosfato	ADP	Adenosin difosfato
mM	Mili molar	IMP	Inosina monofosfato
h	Hora	G6PD	Glucosa-6- fosfato- deshidrogenasa
°C	Grados Centígrados	TNF-α	Factor de necrosis tumoral
nm	Nanómetros	EC	Electroforesis Capilar
μm	Micrómetro	FEO	Flujo electrosmótico
cm	Centímetro	DAD	Arreglo de diodos
kV	Kilovoltios	rpm	Revoluciones por minuto
GSH	Glutación	psi	Libra por pulgada cuadrada

GSSG	Disulfuro de glutatión	NR	Nicotinamida Ribósido
NADH	Nicotinamin Adenin Dinucleótido	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
NADPH	Nicotinamin Adenin Dinucleótido Fosfato Reducido	M	Molar
QA	Ácido Quinolínico	Fig	Figura
NaMN	Ácido Nicotínico Mononucleótido	N	Normal
NaAD	Ácido Nicotínico Adenina Dinucleótido	PBS	Buffer Fosfato Salino
Nam	Nicotinamida	CV	Coeficiente de variación
ATP	Adenosin tri fosfato	Tm	Tiempo de migración

ÍNDICE

1	INTRODUCCION	15
1.1	Nucleótidos de piridina	15
1.1.1	Generalidades.....	15
1.1.2	Propiedades físicas y químicas	16
1.1.3	Biosíntesis.....	18
1.1.3.1	<i>Producción de Novo</i>	18
1.1.3.2	<i>Rutas de rescate</i>	20
1.1.4	Funciones.....	20
1.1.4.1	<i>Oxidoreductasas</i>	21
1.1.4.2	<i>Papel en el metabolismo redox</i>	24
1.1.4.3	<i>Funciones no redox</i>	25
1.1.5	Farmacología	26
1.1.6	Función de NADPH/NADP ⁺ en la esteatohepatitis hepática no alcohólica	26
1.2	Electroforesis Capilar	28
1.2.1	Fundamento de la técnica	29
1.2.2	Movilidad electroforética	30
1.2.3	Flujo electrosmótico	31
1.2.4	Electrolito Soporte.....	32
1.2.5	Calor de Joule	32
1.2.6	Instrumentación	33
1.2.6.1	<i>El capilar</i>	33
1.2.6.2	<i>Introducción de la muestra</i>	33
1.2.6.3	<i>Voltaje</i>	34
1.2.7	Monitoreo en fluidos biológicos por Electroforesis Capilar	34
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	OBJETIVO GENERAL	35
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES	35
3	MATERIAL Y MÉTODOS	36

3.1	Sitio de trabajo	36
3.2	Reactivos	36
3.3	Equipos.....	36
3.4	Animales de experimentación e inducción de hígado graso	37
3.5	Tratamiento óptimo de las muestras.....	37
3.6	Características del capilar y condiciones de análisis por Electroforesis Capilar.....	38
3.7	Método de lavado	38
4	RESULTADOS Y DISCUSION	40
4.1	Condiciones de análisis	41
4.1.1	Selección de la longitud de onda.....	41
4.1.2	Solución amortiguadora	42
4.1.2.1	<i>Naturaleza</i>	42
4.1.2.2	<i>Evaluación del pH de separación</i>	44
4.1.2.3	<i>Concentración de la solución amortiguadora</i>	45
4.1.3	Voltaje.....	46
4.1.4	Introducción de la muestra	48
4.2	Tratamiento de la muestra.....	49
4.2.1	Eliminación de proteínas	49
4.2.1.1	<i>Precipitación isoeléctrica</i>	49
4.2.1.2	<i>Precipitación con solventes orgánicos</i>	51
4.2.1.3	<i>Salting Out</i>	52
4.2.1.4	<i>Desnaturalización</i>	53
4.2.2	Conversión Enzimática	55
4.2.2.1	<i>Tiempo de reacción</i>	57
4.2.2.2	<i>Efecto de la temperatura</i>	58
4.2.2.3	<i>Cantidad de enzima</i>	59
4.3	Optimización de las condiciones electroforéticas con la muestra real	61
4.3.1	Concentración de la solución amortiguadora	61
4.3.2	pH de la solución amortiguadora	63

4.3.3	Lavado del capilar	66
4.4	Determinación de NAD ⁺ , NADH, NADP ⁺ y NADPH	68
4.5	Aplicabilidad del Método Desarrollado	69
4.6	Parámetros estadísticos	70
5	Conclusiones	71
6	perspectivas	71
7	REFERENCIAS.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los nucleótidos de piridina en forma oxidada (NAD ⁺ y NADP ⁺ , izquierda) y reducida (NADH y NADPH, derecha).	17
Figura 2. Espectros de absorción de NAD ⁺ y de NADH.	18
Figura 3. Síntesis de NADP mediante la acción de NAD ⁺ kinasa.	19
Figura 4. Pliegue de Rossman.....	21
Figura 5. Componentes de un equipo de Electroforesis Capilar.....	29
Figura 6. Representación general del proceso electroforético.....	30
Figura 7. Representación del equilibrio de los grupos silanol en la pared del capilar de sílice fundida en función al pH.	32
Figura 8. Espectros de absorción y electroferogramas de los cofactores de Nicotinamida. NAD (A), NADH (B), NADP (C) y NADPH (D).	41
Figura 9. Electroferograma de comparación de resultados empleando tres buffer de corrida diferente.	43
Figura 10. Formación del aducto entre el grupo fosfato y el anillo de piridina de las formas reducidas NADH y NADPH.	43
Figura 11. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μM empleando buffer de boratos pH 8.7 (azul) y pH 9.7 (negro).	44
Figura 12. Electroferograma de una mezcla de estándares de coenzimas (75 μM) empleando solución amortiguadora de boratos 30 mM pH 9.7	45
Figura 13. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μM empleando amortiguador de boratos 20 mM, pH 9.7.	46
Figura 14. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μM empleando amortiguador de boratos 20 mM pH 9.7 empleando 30 kV.	47
Figura 15. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μM empleando amortiguador de boratos 20 mM pH 9.7 empleando 20 kV.	47
Figura 16. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μM empleando amortiguador de boratos 20 mM pH 9.7 empleando 25 kV.	48
Figura 17. Electroferograma de coenzimas extraídas de homogenizado hepático en NaOH 0.01 N.....	49

Figura 18. Electroferograma de coenzimas extraídas de homogenizado hepático en ácido metafosfórico.	50
Figura 19. Electroferograma de coenzimas extraídas de homogenizado hepático en etanol (p/v 2 %) y resuspendido en buffer de boratos 10 mM pH 9.7.....	51
Figura 20. Electroferograma de coenzimas extraídas de homogenizado hepático en cloroformo (p/v 20 %).	52
Figura 21. Electroferograma de coenzimas extraídas de tejido hepático con Tetraborato de sodio 0.005N pH 9.7	53
Figura 22. Electroferograma del aislamiento de las formas reducidas NADH y NADPH en hígado graso (10% p/V) después de ser sometidos a tratamiento térmico de 60 °C.....	54
Figura 23. Electroferograma donde se observa el aislamiento de las formas oxidadas NAD ⁺ y NADP ⁺ en hígado graso después de ser sometidos a tratamiento térmico de 60 °C.	54
Figura 24. Reacción de NAD ⁺ (R=H) o NADP ⁺ (R=PO ₃ ⁻²) con glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) a la forma NADH (R=H) o NADPH (R= PO ₃ ⁻²), con 6-fosfogluconolactato.....	55
Figura 25. Electroferograma de la comparación de la intensidad de señal de los estándares antes (azul marino) y después de la conversión enzimática (negro).	56
Figura 26. Electroferograma donde se compara a las formas oxidadas (NAD ⁺ y NADP ⁺) 1.3 mM (azul oscuro), y a las formas reducidas obtenidas después de la reacción enzimática a 15 min (negro), a 30 min (azul rey) y 45min (rosa).	57
Figura 27. Electroferograma en el que se comparan estándares reducidos incubados por periodo de 1 h a 60 C ^o (rosa), 70°C (negro) y 80°C (azul) comparados con estándar de referencia (azul) 1.5 mM.	58
Figura 28. Electroferograma donde se compara la conversión de los nucleótidos de piridina en forma oxidada a reducida, empleando 2 µL (negro), 4 µL (azul marino) y 6 µL de enzima (azul rey).	59
Figura 29. Electroferograma para soluciones estándar (negro y azul) y una muestra biológica (rosa) sometidos a tratamiento enzimático y eliminación de proteínas.	60
Figura 30. Electroferograma de muestra de hígado graso (p/v 20%) para el monitoreo de NAD ⁺ y NADP ⁺ de manera indirecta a través de NADH (Tm 8 min) y NADPH (Tm 12 min) empleando buffer de boratos 15 mM pH 9.1.	61
Figura 31. Electroferograma de muestra de hígado graso (p/v 20%) para el monitoreo de NAD ⁺ y NADP ⁺ de manera indirecta a través de NADH y NADPH empleando buffer de boratos 20 mM pH 9.1.	62
Figura 32. Electroferograma de muestra de hígado graso (p/v 20%) para el monitoreo de NAD ⁺ y NADP ⁺ de manera indirecta a través de NADH (Tm 8min) y NADPH (Tm 12min) empleando buffer de boratos 30 mM pH 9.1.	62

Figura 33. Electroferograma de la determinación directa de NADH y NADPH en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM, pH 9.1 y detección a 260nm.....	63
Figura 34. Electroferograma de la determinación indirecta de NAD ⁺ y NADP ⁺ en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM pH 9.1 y detección a 260nm.....	64
Figura 35. Electroferograma de la determinación directa de NADH y NADPH en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM pH 9.5 a 260nm.	64
Figura 36. Electroferograma de la determinación indirecta de NAD ⁺ y NADP ⁺ en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM pH 9.5 a 260nm.	65
Figura 37. Electroferograma de la determinación directa de NADH y NADPH en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM pH 9.3 a 260nm.	65
Figura 38. Electroferograma de la determinación indirecta de NAD ⁺ y NADP ⁺ en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM, pH 9.3 y detección a 260nm.....	66
Figura 39. Superficie del capilar y desprotonación de los grupos silanol mediante el empleo de NaOH.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Deshidrogenasas piridin dependientes	23
Tabla 2. Promedios obtenidos de la relación de NADH/ NAD ⁺ y NADPH/NADP ⁺ de 16 muestras de ratas de las cuales 8 son control y 8 con hígado graso.	69
Tabla 3. Cálculo del coeficiente de variación en los tiempos de migración de los analitos.	70

1 INTRODUCCION

La enfermedad del hígado graso no alcohólico es un problema de salud pública, asociada con resistencia a la insulina, obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2. Dentro de su presentación evolutiva, la enfermedad incluye esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis y hepatocarcinoma. La esteatohepatitis es producida por el exceso de ácidos grasos, los cuales pueden inducir producción de especies reactivas de oxígeno, una reacción inflamatoria que deriva en disfunción y muerte celular a través de apoptosis o necrosis. La sobrecarga de lípidos y sus consecuencias en el hepatocito, derivan de alteraciones del estado redox intracelular, el cual, se establece por varias parejas redox como son: NADH/NAD^+ , NADPH/NADP^+ y GSH/GSSG . Estas relaciones indican disponibilidad de equivalentes reductores requeridos para la lipogénesis de novo, mecanismo mediante el cual los carbohidratos son transformados en lípidos. La sobre-regulación de este proceso contribuye a la enfermedad de hígado graso no alcohólico asociado con obesidad. Actualmente, se cuenta con diferentes técnicas para el estudio de NADH/NAD^+ y NADPH/NADP^+ , destacando entre ellas la electroforesis capilar, que es altamente sensible, reproducible y de bajo costo en comparación con las determinaciones convencionales; el desarrollo de dicho método es de gran interés, ya que permite monitorear las relaciones redox durante el establecimiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, brindando así una nueva posibilidad para el diagnóstico temprano.

1.1 Nucleótidos de piridina

1.1.1 Generalidades

La Dinucleótido de Adenin Nicotinamida NAD^+ , también llamada difosfopiridina nucleótido y Coenzima I, es una coenzima presente en todas las células vivas. En el metabolismo, el NAD^+ participa en las reacciones redox (oxido-reducción) llevando los electrones de una reacción a otra. Por tanto, se encuentra en dos formas en las células: NAD^+ y NADH . El NAD^+ , es un agente oxidante, acepta electrones de otras moléculas y pasa a ser reducido, formando NADH , que puede ser utilizado como agente reductor que dona electrones. Estas reacciones de transferencia de electrones son la principal

función del NAD⁺. Sin embargo, también es utilizado en otros procesos celulares, en especial como sustrato de enzimas que añaden o eliminan grupos químicos en las proteínas, en modificaciones post-traduccionales. Debido a la importancia de estas funciones, las enzimas que intervienen en el metabolismo del NAD⁺ son blanco terapéutico para el diseño de medicamentos. El NAD⁺ también se convierte en nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺), cuya química es similar a la de la coenzima NAD⁺, aunque tiene diferentes funciones en el metabolismo.

1.1.2 Propiedades físicas y químicas

El NAD⁺ tiene la fórmula molecular C₂₁H₂₇N₇O₁₄, su peso molecular es de 663.425 g/mol y su punto de fusión es de 160 °C. Consta de dos nucleótidos unidos por su par de grupos fosfato. Los nucleótidos consisten de anillos de ribosa, uno con adenina adjunta al primer átomo de carbono (la posición 1') y el otro con nicotinamida en la misma posición (Figura 1). El grupo nicotinamida puede estar conectado en dos orientaciones a este átomo de carbono anomérico; debido a estas dos posibles estructuras, el compuesto existe como dos diastereoisómeros. La β-nicotinamida diastereoisómero de NAD⁺ es la que se encuentra en los organismos. Estos nucleótidos están unidos por un puente de dos grupos fosfato a través de los carbonos 5'. En apariencia, todas las formas de esta coenzima son sustancias amorfas de color blanco, higroscópicas y muy solubles en agua. Los sólidos son estables si se conservan en seco y en la oscuridad. Las soluciones de NAD⁺ son incoloras y estables durante más o menos una semana a 4°C y pH neutro, pero se descomponen rápidamente en ácidos o álcalis. Cuando se descomponen, forman productos que inhiben a la enzima dependiente de la coenzima.

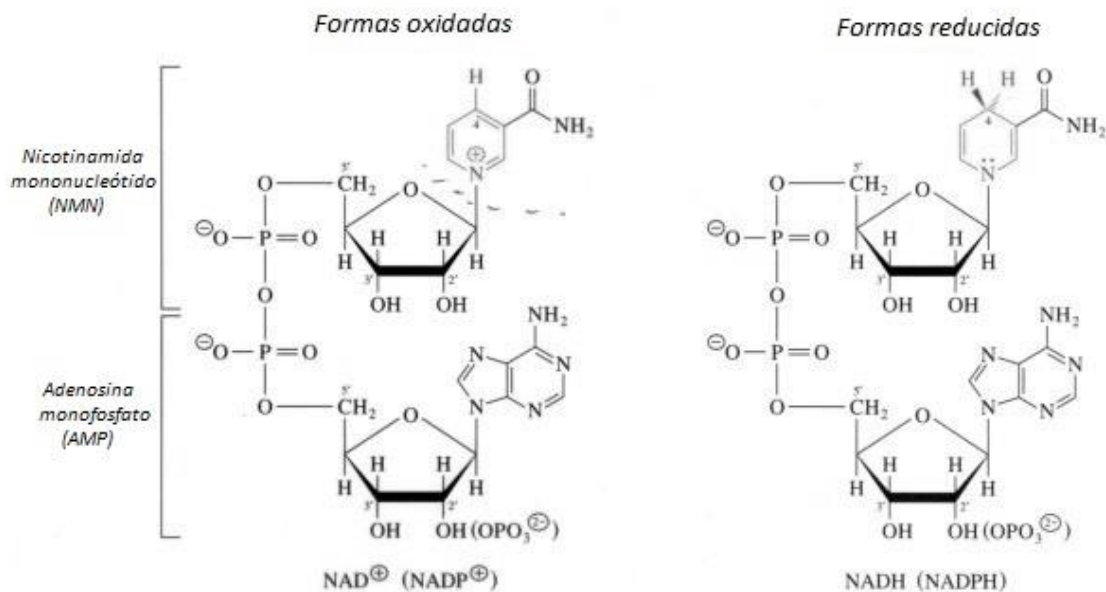


Figura 1. Los nucleótidos de piridina en forma oxidada (NAD⁺ y NADP⁺, izquierda) y reducida (NADH y NADPH, derecha).¹

Tanto el NAD⁺ como el NADH absorben intensamente en el ultravioleta, debido a la base adenina. El pico de máxima absorción del NAD⁺ se encuentra en una longitud de onda de 260 nm, con un coeficiente de extinción de 16,900 M⁻¹cm⁻¹. El NADH también absorbe a longitudes de onda mayores, con un segundo pico de absorción en el ultravioleta, a 340 nm, con un coeficiente de absortividad molar de 6220 M⁻¹cm⁻¹ (Figura 2).

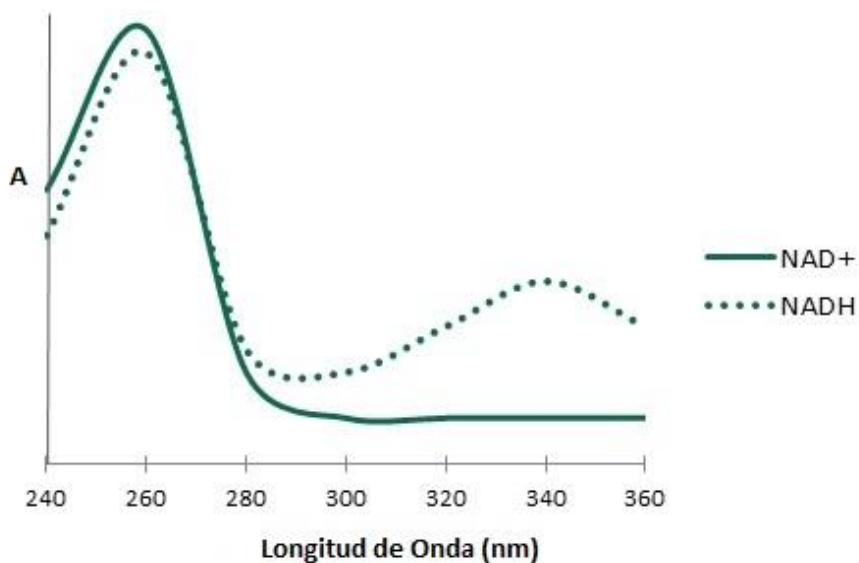


Figura 2. Espectros de absorción de NAD⁺ y de NADH.²

1.1.3 Biosíntesis

El NAD⁺ se sintetiza a través de dos rutas metabólicas: una ruta de novo a partir de aminoácidos, o en rutas de rescate mediante el reciclado de componentes preformados como nicotinamida convertida de nuevo a NAD⁺.

1.1.3.1 Producción de Novo

La mayoría de los organismos sintetizan NAD⁺ a partir de componentes simples. El conjunto específico de reacciones varía entre los organismos, una característica común es la generación de ácido Quinolínico (QA) a partir de un aminoácido, ya sea triptófano en los animales y algunas bacterias, o bien ácido aspártico en algunas bacterias y plantas. El ácido Quinolínico se convierte en ácido nicotínico Mononucleótido (NaMN) mediante transferencia de un grupo fosforibosa. Un grupo adenilato se transfiere entonces para formar ácido nicotínico adenina dinucleótido (NaAD). Por último, el grupo ácido nicotínico del NaAD es amidado a un grupo nicotinamida (Nam), formando

nicotinamida adenina dinucleótido. En un nuevo paso, algunos NAD^+ se convierten en NADP^+ mediante la NAD^+ kinasa, que fosforila el NAD^+ .³

En la mayoría de los organismos, esta enzima utiliza ATP como fuente del grupo fosfato, aunque en las bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* y en las arqueas como *Pyrococcus horikoshii*, el polifosfato inorgánico es una alternativa como donante de fosfato.

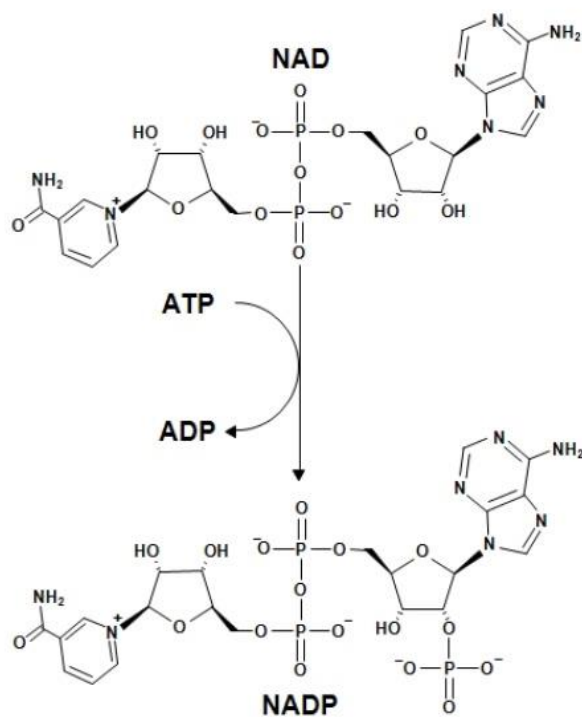


Figura 3. Síntesis de NADP mediante la acción de NAD^+ kinasa.⁴

1.1.3.2 Rutas de rescate

Además de formar NAD^+ de novo a partir de aminoácidos precursores simples, las células también reciclan compuestos preformados que contengan nicotinamida. Aunque se conocen otros precursores, los tres compuestos naturales que contienen el anillo nicotinamida y usan las rutas de reciclaje son el ácido nicotínico (Na), la nicotinamida (Nam) y la nicotinamida ribósido (NR). Los precursores son reciclados a NAD(P)^+ a través de reacciones de adenilación y fosforibosilación. Estos compuestos se pueden tomar a partir de la dieta, como la vitamina B3 o niacina. Sin embargo, estos compuestos también son producidos en las células, cuando el grupo nicotinamida se libera a partir del NAD^+ en las reacciones de transferencia de ADP-ribosa. De hecho, las enzimas que participan en dichas rutas de rescate parecen estar concentradas en el núcleo de la célula, lo que puede compensar el alto nivel de reacciones que consumen NAD^+ en este organelo. Las células también pueden tomar NAD^+ extracelular a partir de su entorno. A pesar de la presencia de la ruta de novo, las reacciones de rescate son esenciales en los seres humanos. Una carencia de nicotinamida en la dieta provoca una enfermedad llamada pelagra.

Esta elevada exigencia de NAD^+ resulta del constante consumo de la coenzima en reacciones como las modificaciones post-trasduccionales, ya que el ciclo del NAD^+ entre las formas oxidadas y reducidas en las reacciones redox no cambia los niveles generales de la coenzima. Las rutas de rescate utilizadas por los microorganismos difieren de las de los mamíferos. Por ejemplo, algunos agentes patógenos, como la levadura *Cándida glabrata* y la bacteria *Haemophilus influenzae* son auxótrofos de NAD^+ , es decir, no pueden sintetizar NAD^+ y dependen de las rutas de rescate. Aún más sorprendente es el patógeno intracelular *Chlamydia trachomatis*, que carece de genes implicados en el rescate o en la biosíntesis de NAD^+ y NADP^+ , y que en su lugar obtiene estas coenzimas de su anfitrión.⁵

1.1.4 Funciones

La nicotinamida adenina dinucleótido tiene varias funciones esenciales en el metabolismo. Actúa como coenzima en las reacciones redox, como donante de grupos ADP-ribosa en las reacciones de ADP-ribosilación, como precursor del segundo mensajero de la molécula cíclica de ADP-ribosa, así

como sustrato para las DNA ligasas bacterianas y un grupo de enzimas llamadas sirtuinas, que usan NAD^+ para eliminar los grupos proteicos acetilo.

1.1.4.1 Oxidoreductasas

La principal función del NAD^+ en el metabolismo es la transferencia de electrones de una reacción redox a otra. Este tipo de reacción es catalizada por un gran grupo de enzimas llamadas oxidoreductasas. Los nombres correctos para estas enzimas contienen los nombres de sus sustratos: por ejemplo, la NADH-ubiquinona oxidoreductasa cataliza la oxidación del NADH por la coenzima Q. Sin embargo, estas enzimas son también conocidas como deshidrogenasas o reductasas, por lo que la NADH-ubiquinona oxidoreductasa también suele ser llamada NADH deshidrogenasa o, a veces, coenzima Q reductasa.

Cuando están enlazados a una proteína, el NAD^+ y el NADH suelen mantenerse en una estructura conocida como pliegue Rossmann (Figura 4.). El nombre proviene de Michael Rossmann, que fue el primer científico en darse cuenta de lo común que es esta estructura dentro de las proteínas enlazadas a nucleótidos.

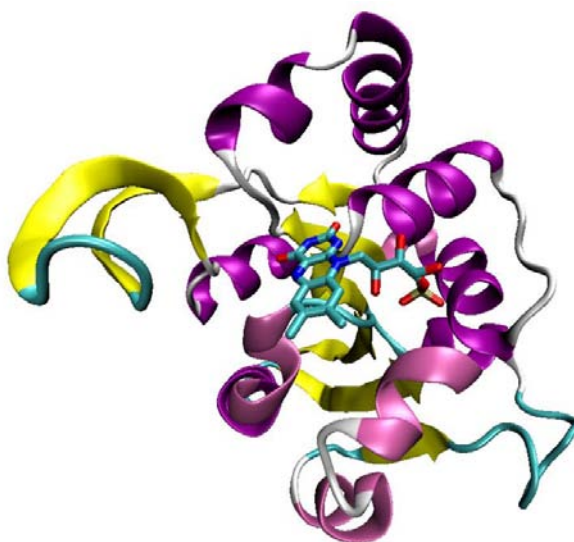


Figura 4. Pliegue de Rossmann

Este pliegue contiene tres o más hebras beta paralelas enlazadas mediante dos hélices alfa en el orden beta-alfa-beta-alfa-beta. Esto forma una hoja beta flanqueada por una capa de hélices alfa a cada lado. Debido a que cada pliegue Rossmann enlaza un nucleótido, los dominios de enlace para el dinucleótido NAD^+ consisten de dos pares de pliegues Rossmann, con cada pliegue enlazando un nucleótido dentro del cofactor. Sin embargo, este pliegue no es universal entre las enzimas dependientes de NAD^+ , ya que se ha descubierto recientemente que una clase de enzimas bacterianas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos se enlazan a la coenzima pero carecen de esta forma de pliegue.

Cuando se enlaza al sitio activo de una oxidoreductasa, el anillo nicotinamida de la coenzima se coloca de modo que pueda aceptar un hidruro del otro sustrato. Ya que el carbono C_4 que acepta el hidrógeno es proquiral, esto puede ser explotado en la cinética de enzimas para dar información sobre el mecanismo enzimático. Esto se hace mediante la mezcla de una enzima con un sustrato que tiene átomos de deuterio sustituidos por los hidrógenos, de tal forma que la enzima reducirá el NAD^+ mediante la transferencia de un deuterio en lugar de un átomo de hidrógeno. En este caso, una enzima puede producir uno de los dos estereoisómeros de NADH. En algunas enzimas, el hidrógeno se transfiere desde el plano superior del anillo de nicotinamida (las oxidorreductasas clase A), mientras que en otras enzimas (las oxidorreductasas de clase B) la transferencia se produce desde abajo.

A pesar de esta similitud en la forma en que las proteínas se unen a las coenzimas, las enzimas casi siempre muestran un alto nivel de especificidad, ya sea por el NAD^+ o el NADP^+ . Esta especificidad refleja las distintas funciones metabólicas de las dos coenzimas, y es el resultado de diferentes clases de residuos de aminoácidos en los dos tipos de sitios de unión a la coenzima. Por ejemplo, en el sitio activo de las enzimas dependientes de ADP, se forma un enlace iónico entre una cadena lateral de aminoácidos básicos y el grupo fosfato ácido del NADP^+ . Por el contrario, en las enzimas dependientes de NAD^+ , la carga en este pliegue se invierte, impidiendo el enlace del NADP^+ . Sin embargo, hay algunas excepciones a esta regla general, y enzimas como la aldosa reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y la metilentetrahidrofolato reductasa pueden utilizar ambas coenzimas en algunas especies. Se conocen al menos unas 200 deshidrogenasas piridin dependientes, y actúan en diferentes aspectos del metabolismo, las más destacadas se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Deshidrogenasas piridin dependientes

Enzima	Localización	Función
β-hidroxibutirato- deshidrogenasa	Mitocondria 	Conversión de Acetoacetato a β -hidroxibutirato genera NAD^+ en la formación de cuerpos cetónicos
Lactato deshidrogenasa	Citosol 	Reducción de piruvato a lactato generando NAD^+ a partir de NADH
Malato deshidrogenasa	Mitocondria y Citosol 	Oxidación de L-malato a Oxalacetato en la última etapa del ciclo del ácido cítrico generando $\text{NADH}+\text{H}$
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	Citosol 	Cataliza el primer paso de la vía de las pentosas fosfato, generando NADPH que es esencial para otras rutas biosintéticas.

1.1.4.2 Papel en el metabolismo redox

Las reacciones redox catalizadas por oxidorreductasas son vitales en todo el metabolismo, pero una parte particularmente importante es la liberación de energía de los nutrientes. Los compuestos reducidos, como la glucosa, se oxidan, liberando así la energía. Esta energía se transfiere al NAD^+ mediante reducción a NADH, como parte de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs). En eucariotas, los electrones transportados por el NADH que se produce en el citoplasma mediante glucólisis son transferidos al interior de la mitocondria por lanzaderas mitocondriales, como la lanzadera malato-aspartato. El NADH es oxidado a su vez por la cadena de transporte de electrones, que bombea protones a través de la membrana y genera ATP a través de la fosforilación oxidativa. Estos sistemas de lanzadera también tienen la misma función de transporte en los cloroplastos.⁶

Dado que tanto las formas oxidadas como reducidas de NAD^+ se utilizan en estos conjuntos de reacciones enlazadas, la célula mantiene aproximadamente concentraciones iguales de NAD^+ y NADH. Una proporción alta de NADH/NAD^+ permite a este coenzima actuar como agente oxidante y como reductor. En contraste, la función principal del NADP^+ es como agente reductor en el anabolismo, estando la coenzima implicada en rutas como la síntesis de ácidos grasos y la fotosíntesis. Dado que el NADPH es necesario para conducir las reacciones redox como un fuerte agente reductor, la proporción $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ se mantiene muy baja. Aunque es importante en el catabolismo, el NADH se utiliza también en las reacciones anabólicas, como la gluconeogénesis. Esta necesidad de NADH en el anabolismo plantea un problema creciente para los procariotas que crecen en nutrientes que liberan sólo una pequeña cantidad de energía. Por ejemplo, las bacterias nitrificantes como Nitrobacter oxidan el nitrito a nitrato, lo que libera energía suficiente para bombear los protones y generar ATP, pero no la suficiente como para producir NADH directamente. Como el NADH sigue siendo necesario para las reacciones anabólicas, estas bacterias utilizan una nitrito oxidoreductasa para producir la suficiente fuerza motriz de protones como para ejecutar parte de la cadena de transporte de electrones en sentido inverso, generando NADH.⁷

1.1.4.3 Funciones no redox

La coenzima NAD^+ se consume también en las reacciones de transferencia de ADP-ribosa. Por ejemplo, las enzimas llamadas ADP-ribosiltransferasas añaden la fracción ADP-ribosa de esta molécula a las proteínas, en una modificación postraduccional llamada ADP-ribosilación. Esta reacción implica la adición de un solo grupo ADP-ribosa (mono-ADP-ribosilación), o la transferencia de ADP-ribosa a las proteínas en cadenas largas ramificadas (poli-ADP-ribosilación). La mono-ADP-ribosilación se identificó por primera vez como el mecanismo de un grupo de toxinas bacterianas, en particular la toxina del cólera, pero también participan en la señalización celular normal. La poli-ADP-ribosilación es llevada a cabo por las polimerasas poli-(ADP-ribosa). La estructura de poli-(ADP-ribosa) está implicada en regular varios eventos celulares, destacando la reparación del ADN o el mantenimiento del telómero.⁸

Otra función de esta coenzima en la señalización celular es como precursor de la ADP-ribosa cíclica, que se produce a partir de NAD^+ por ADP-ribosil ciclasas, como parte de un sistema de segundo mensajero. Esta molécula actúa en la señalización de calcio mediante la liberación de calcio de las reservas intracelulares. Esto lo hace mediante el enlace y apertura de una clase de canales de calcio llamados receptores de rianodina, que se encuentran en las membranas de los orgánulos como el retículo endoplasmático. El NAD^+ también es consumido por las sirtuinas, que son deacetilasas dependientes de NAD, como la Sir2. Estas enzimas actúan mediante la transferencia de un grupo acetilo de sus proteínas sustrato a la fracción ADP-ribosa del NAD^+ ; esto rompe la coenzima y libera nicotinamida y O-acetil-ADP-ribosa. Las sirtuinas parecen estar implicadas en la regulación de la transcripción a través de histonas deacetilantes y alteración de la estructura del nucleosoma. Aunque las proteínas no histonas pueden ser desacetiladas también por las sirtuinas. Esta actividad de las sirtuinas es especialmente interesante debido a su importancia en la regulación del envejecimiento.⁹

1.1.5 Farmacología

Las enzimas que sintetizan y utilizan NAD^+ y NADH son importantes tanto en la farmacología actual como en la investigación de futuros tratamientos para enfermedades. La coenzima NAD^+ es potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. El NAD^+ es también un objetivo directo del medicamento isoniacida, que se utiliza en el tratamiento de la tuberculosis, una infección causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Dado que un gran número de oxidorreductasas son dependientes de NAD^+ y NADH como sustratos, y se enlazan a ellos mediante una forma estructural muy conservada, se sugiere que los inhibidores de NAD^+ sean específicos para cada enzima, algo que resulta sorprendente. Por ejemplo, los inhibidores basados en los compuestos de ácido micofenólico y tiazofurina inhiben la IMP deshidrogenasa en el sitio de unión del NAD^+ . Debido a la importancia de esta enzima en el metabolismo de las purinas, estos compuestos pueden ser útiles como anti cancerígenos, antivirales o fármacos inmunosupresores. Otros fármacos no son inhibidores de la enzima, sino que activan las enzimas que participan en el metabolismo del NAD^+ . Las enzimas sirtuinas son un objetivo particularmente interesante para tales medicamentos, ya que la activación de estas deacetilasas dependientes de NAD^+ extiende su vida útil. Los compuestos como el resveratrol aumentan la actividad de estas enzimas, lo que puede ser importante en cuanto a su capacidad para retrasar el envejecimiento, tanto en vertebrados como en invertebrados.¹⁰

1.1.6 Función de $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ en la esteatohepatitis hepática no alcohólica

El NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) se utiliza en las reacciones anabólicas, como la síntesis de lípidos y ácidos nucleicos, que requieren NADPH como agente reductor.

La fase oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato es la principal fuente de NADPH en las células. El NADPH proporciona los equivalentes reductores para las reacciones biosintéticas y de oxidación-reducción involucradas en la protección contra la toxicidad de las especies de oxígeno reactivas. También se emplea en las rutas anabólicas, como síntesis de lípidos, de colesterol y elongación de la cadena de ácidos grasos. Asimismo, es la fuente de equivalentes reductores en la hidroxilación de compuestos aromáticos, esteroides, alcoholes y otras sustancias.

El equilibrio entre las formas oxidadas y reducidas de NAD celular refleja tanto las actividades metabólicas como la salud de las células. Los efectos de la proporción NADH/NAD⁺ son complejos, y controlan la actividad de varias enzimas, incluyendo la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es una enzima constitutiva presente en la mayoría de las células con una función clave, dado que limita el flujo de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato, generando pentosas fosfato y NADPH, este último indispensable en biosíntesis reductora y en mantener el estado redox celular. El NADPH es un cofactor esencial para la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH) mediante la reacción catalizada por la glutatión reductasa, la cual tiene la propiedad de metabolizar especies reactivas de oxígeno. En este contexto aparentemente la relación NADPH/NADP⁺ es crítica para el estado redox intracelular y su alteración pudiera favorecer la esteatosis y el estrés oxidante características de la enfermedad del hígado graso no alcohólica.

En la obesidad se ha demostrado que un aumento en la actividad y expresión de la G6PD, así como en la relación de NADPH/NADP⁺ estimulan la expresión de genes marcadores del adipocito, aumento de TG y liberación de ácidos grasos libres en el medio.¹¹ Además de reducir adiponectina y de incrementar la expresión de TNF- α , interleucina-6 y resistina. Al mismo tiempo, la sobre-expresión de G6PD exacerba la producción de especies reactivas de oxígeno y de señales inflamatorias, que pudiera influir en la sensibilidad a la insulina y permitir el reclutamiento e infiltración de macrófagos en dicho tejido. En el paciente con deficiencia de la G6PD se ha observado un decremento en la velocidad lipogénica y en las concentraciones de lipoproteínas, de aquí la importancia de la G6PD en la síntesis de ácidos grasos^{12,13} Concomitante con esto la dehidroepiandrosterona, inhibidor de la G6PD interfiere con la adipogénesis al reducir la relación NADPH/NADP⁺.^{14,15, 16}

1.2 Electroforesis Capilar

La Electroforesis Capilar (EC) es una de las técnicas de separación más utilizadas en la actualidad a nivel mundial. Su mayor área de impacto está vinculada con el análisis de biomoléculas, apoyando así a un sin número de áreas y permitiendo resolver gran variedad de problemas analíticos. Desde siempre, los científicos que trabajan con material de origen biológico han tenido la necesidad de separar y examinar las propiedades de moléculas con peso molecular alto, tales como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, lípidos complejos, carbohidratos y aún fragmentos de DNA. El principal reto es no dañarlas o mantener sus propiedades de tal forma que no sean modificadas significativamente; esto es lo que lleva al mejoramiento de equipo y desarrollo de nuevas técnicas. Sus principales ventajas son: alta resolución, alta eficiencia de separación, corto tiempo de análisis, pequeñas cantidades de muestra y separación de un sin número de compuestos, y una gama de mecanismos que proporcionan una separación selectiva. La EC se asemeja a las técnicas electroanalíticas de separación en las que las variables electrolíticas son decisivas en el proceso separativo; no obstante, existe una diferencia fundamental, se minimiza la electrólisis. El mecanismo de separación de la electroforesis capilar es el mismo de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuáles a su vez están vinculadas con la relación carga/masa y con la conformación de los analitos. Para ello, el capilar de separación se llena con electrolito soporte (solución amortiguadora) y se coloca entre dos depósitos que también lo contengan: los electrodos son conectados a una fuente de poder, que genera hasta 30 kV, y se sumergen en los depósitos por separado. La introducción de una muestra se realiza sustituyendo un depósito de solución amortiguadora por el contenedor con la muestra durante este proceso. Un volumen de muestra definido es introducido en el tubo capilar, ya sea por presión o por la aplicación de un pequeño voltaje por algunos segundos. Después se aplica una diferencia de potencial (o de corriente) para realizar la separación. Las especies iónicas en la muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa; eventualmente pasan por un detector y la señal obtenida entonces se conoce como Electroferograma.^{17.18}

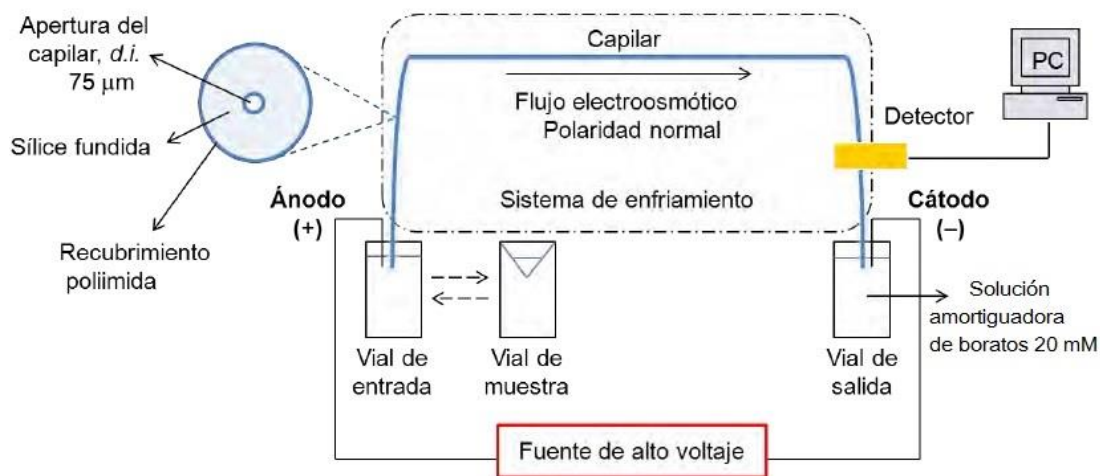


Figura 5. Componentes de un equipo de Electroforesis Capilar.¹⁹

1.2.1 Fundamento de la técnica

Muchas moléculas importantes en biología, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y pueden tenerse en disolución en forma de especies con carga eléctrica, tanto como cationes (+) o como aniones (-). Además, las moléculas que tienen cargas similares poseen distintas relaciones carga/masa, debido a inherentes diferencias de peso molecular. En conjunto, estas diferencias constituyen la base suficiente para una migración diferencial, cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico, por la imposición de una diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos. Los cationes se trasladan hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+) a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas que migran y el medio circundante, que son principalmente fuerzas de fricción electrostáticas. El material de la muestra debe estar en solución, puede ser en agua o en un disolvente miscible con el agua, de tal manera que sea miscible con el medio conductor (electrolito soporte) para que tenga efecto el fenómeno electroforético. La corriente se mantiene por todo el circuito ya que los electrodos están sumergidos en una especie de viales que contiene solución amortiguadora. Durante la separación en

los electrodos se producen iones hidroxilo e hidrógeno en el cátodo, mientras que en el ánodo se forman oxígeno e iones hidrógeno.

En disolución libre, hay una resistencia de fricción mínima entre los iones y la disolución, y tiene lugar una rápida migración de los iones. La versatilidad de la electroforesis para la separación de sustancias con carga eléctrica, desde pequeños iones inorgánicos hasta grandes moléculas, dependen en gran parte de que se lleve a cabo sobre o en un medio de soporte adecuado y relativamente homogéneo. Algunas veces puede idearse un medio que interactúe específicamente con los iones que hay que separar, para explotar así las diferencias de la relación carga/masa e introducir de este modo fuerzas de retardo especiales que convengan al análisis. Como se ha mencionado, las separaciones electroforéticas se originan por las diferentes movilidades de los analitos. La movilidad electroforética se ve afectada por la carga, la forma y el tamaño del analito, así como de la viscosidad del medio. Las propiedades del disolvente tales como la fuerza iónica, el pH y la constante dieléctrica, también son importantes porque influyen sobre la carga efectiva del analito y, en el caso de moléculas grandes, sobre su forma y tamaño hidrodinámico.

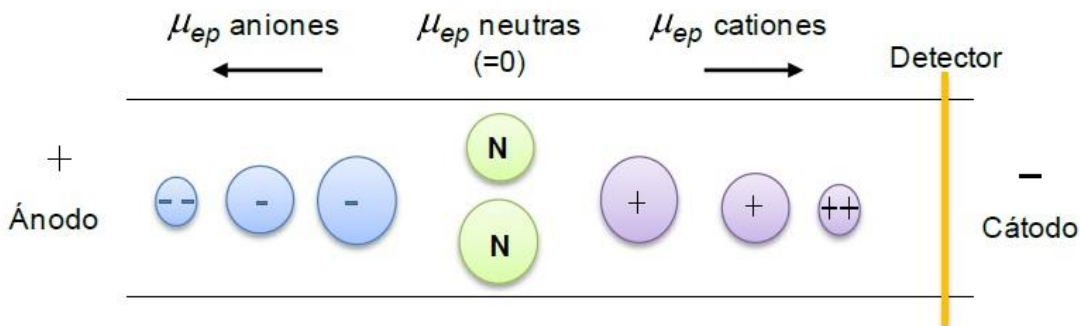


Figura 6. Representación general del proceso electroforético.

1.2.2 Movilidad electroforética

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de una analito, cuando ningún flujo electrosmótico está presente puede ser dado por la siguiente ecuación

$$u = \mu E$$

Donde:

u = la velocidad del analito

μ = la movilidad electroforética

E = campo eléctrico

El campo eléctrico es una simple función de la aplicación del voltaje y la longitud del capilar (voltios/cm). La movilidad electroforética depende de la especie iónica, del tamaño, de la carga, de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del analito.

1.2.3 Flujo electrosmótico

Un constituyente fundamental de la Electroforesis Capilar es el llamado Flujo Electrosmótico (FEO). Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol (a pH mayor de 4) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica.^{20, 21, 22}

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol, H^+) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electrosmótico.

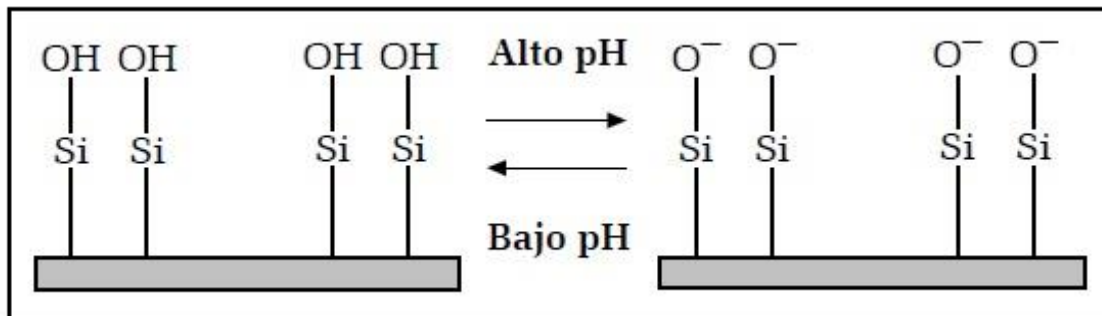


Figura 7. Representación del equilibrio de los grupos silanol en la pared del capilar de sílice fundida en función al pH.²³

Bajo condiciones alcalinas la superficie del sólido posee un exceso de cargas negativas (Figura 6). Esto resulta de la ionización de la superficie (equilibrio ácido-base), de la adsorción de las especies iónicas a la superficie, o de ambas. Para la sílice fundida probablemente ocurren ambos procesos, aunque el FEO se controla más por el gran número de grupos silanol (SiOH) que pueden existir en forma ionizada (SiO⁻).

1.2.4 Electrolito Soporte

El amortiguador determina y estabiliza el pH del medio soporte, además determina las especies químicas predominantes de los analitos con propiedades ácido-base, por lo que afecta a la velocidad de migración de los compuestos en diversas formas. También proporciona un medio conductor, la cantidad de iones determina la fuerza iónica del mismo y por tanto afecta la corriente eléctrica a obtener.

1.2.5 Calor de Joule

La principal ventaja de llevar a cabo la separación electroforética en capilares es la reducción del efecto de calentamiento, el cual tradicionalmente limitaba a las técnicas electroforéticas. El calentamiento es un problema grave ya que provoca gradientes de temperatura no uniformes, cambios locales de viscosidad y subsecuentemente zonas de ensanchamiento. El calor generado por el paso de corriente eléctrica es llamado *Calor de Joule*. El incremento de temperatura depende del

potencial generado (producto del voltaje y la corriente) y está determinado por las dimensiones del capilar, la conductividad del amortiguador y el voltaje aplicado. Lo anterior provoca falta de reproducibilidad en los resultados, por ello es vital evitar corrientes eléctricas elevadas.

1.2.6 Instrumentación

1.2.6.1 El capilar

Por lo general, los capilares que se emplean en electroforesis están hechos de sílice fundida y sin recubrimiento interno. Las variaciones en el diámetro y en la longitud del capilar pueden afectar la resolución electroforética. El aumento de la longitud del capilar da como resultado un tiempo de migración más prolongado, que suele aumentar la resolución y genera una corriente más baja.

1.2.6.2 Introducción de la muestra

El volumen de muestra introducido al sistema es un aspecto de suma importancia en EC ya que con el volumen adecuado se pueden obtener mejores señales en los electroferogramas. Esto es, un volumen grande de inyección de muestra produce un límite de detección y cuantificación bajos, además de la posible saturación del capilar, la cual deformará los picos presentes en el electroferograma perdiendo resolución entre las especies debido al traslape de las mismas. Por otro lado un volumen pequeño genera señales que pueden confundirse con ruido.

EC cuenta con dos mecanismos de introducción de muestra:

- Electrocinético
- Hidrodinámico

El mecanismo electrocinético se basa en las propiedades eléctricas de los componentes de la muestra, en donde las especies iónicas son introducidas mediante la aplicación de un voltaje. Este mecanismo tiene el inconveniente de que las especies no son introducidas de manera homogénea ya que dependen de su carga, tamaño y la polaridad utilizada.

Por otro lado, la introducción hidrodinámica, se lleva a cabo mediante diferencia de presión, es decir, forzando la introducción de la muestra al capilar. Este es un sistema confiable y no selectivo que permite obtener resultados altamente reproducibles, debido a que el volumen introducido se encuentra en función de la dimensión del capilar, la viscosidad del medio, la presión aplicada y el tiempo en el que dicha presión se ejerce.

1.2.6.3 Voltaje

El voltaje regula la corriente y, por lo tanto, la velocidad de migración es proporcional a la diferencia de potencial existente en el medio de soporte. La EC ofrece la ventaja de aplicar elevados voltajes que minimizan los periodos de análisis, sin embargo, la corriente que es capaz de soportar el equipo y la elevada o baja fuerza iónica dada por la concentración de la solución amortiguadora al aplicar una diferencial de potencial, determinan el voltaje que puede ser aplicado en el medio.

1.2.7 Monitoreo en fluidos biológicos por Electroforesis Capilar

Un prerrequisito para el monitoreo de determinado analito en fluidos biológicos (suero, orina, extracto de tejidos, bilis, etc.) es el desarrollo y validación de un método analítico que permita la

determinación exacta de su concentración. Una de las desventajas de los fluidos biológicos es la presencia de otros varios compuestos como proteínas, altas concentraciones de sales, etc., sin embargo, la aplicación de algún pretratamiento como extracción, ultra-centrifugación, filtración, etc, aparte de eliminar interferencias pueden ayudar a aumentar la sensibilidad hasta los niveles requeridos.²⁴

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método analítico por electroforesis capilar que permita monitorear la relación de NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ en tejido hepático de ratas con modelo de hígado graso y control.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones óptimas de análisis que permitan la identificación y separación de NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH.
- Seleccionar el tratamiento adecuado del tejido hepático que permita el monitoreo de las coenzimas con el método establecido.
- Evaluar los parámetros estadísticos del método a fin de establecer su confiabilidad.
- Monitorear la relación de las coenzimas en tejido hepático de ratas con modelo de hígado graso y control.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Sitio de trabajo

El trabajo experimental se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”. Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

3.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron de grado analítico adquiridos de las casas comerciales: Sigma Aldrich (NAD, NADH, NADP, NADPH y Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa). Técnica Química S. A. (KH_2PO_4), Mallinckrodt Chemical Works ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Productos Químicos Monterrey S. A. (MgCl_2 y NaOH).

3.3 Equipos

- Equipo de Electroforesis Capilar ProteomeLab PA800 (Beckman Coulter), con detector de arreglo de diodos DAD.
- Balanza Analítica (Sartorius AX224).
- Centrifugadora (Thermo Scientific Sorvall ST40R).
- Potenciómetro (Beckman Expandomatic SS-2).
- Homogenizador (Polytron PT 1200).
- Temp Blok Module Heater (Lab-Line Instruments, Inc.).

3.4 Animales de experimentación e inducción de hígado graso

El presente trabajo utilizó 16 ratas macho (Sprague Dawley) de 2 meses de edad con un peso promedio entre 230 y 250 gramos distribuidos al azar en dos lotes y sujetos a los siguientes tratamientos: 1) Control, 2) Fructosa. La fructosa al 40 % fue administrada en agua de beber por 16 semanas *ad libitum*; el control recibió solo agua. Los roedores fueron mantenidos conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), para el cuidado y uso de animales de laboratorio. La dieta de los roedores fue Chaw (Purina) *ad libitum*. Al terminar los tratamientos los animales fueron sacrificados bajo anestesia (pentobarbital sódico) procediendo a disectar fragmentos de hígado. Una vez obtenidos los fragmentos fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

3.5 Tratamiento óptimo de las muestras

Fragmentos de hígado fueron homogeneizados al 20% (P/V), centrifugados a 1500 rpm por 20 min, y separados en dos alícuotas (200 µL). Una fue tratada enzimáticamente para transformar NAD⁺ y NADP⁺ a sus formas reducidas NADH y NADPH, respectivamente (Figura 2). La mezcla de reacción contenía glucosa-6-fosfato 9 mM, MgCl₂ 0.1 mM y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (*Saccharomyces cerevisiae*) más 200 µL del sobrenadante, se procedió a incubar 30 min a 37 °C. Terminado el tiempo de reacción, las muestras más las alícuotas destinadas para la determinación directa fueron calentadas a 60 °C por 1 h y centrifugadas a 1500 rpm por 20 min, los sobrenadantes fueron filtrados a través de una membrana de acetato de celulosa previamente tratada (H₂O/NaOH/H₂O, centrifugando a 7000 rpm por diez minutos después de cada paso). Antes de inyectar la muestra se determinó proteínas totales para corroborar la exclusión total de macromoléculas.

3.6 Características del capilar y condiciones de análisis por Electroforesis Capilar

El presente estudio utilizó el equipo de Electroforesis capilar con detector de arreglo de diodos y controlado mediante el software Karat 8.0.. El método de análisis desarrollado requiere un acondicionamiento del capilar de 7 minutos con la solución amortiguadora seleccionada a 35 psi. La inyección de la muestra al capilar fue por presión hidrodinámica por 5 s a 0.5 psi, realizando el análisis a 25 kV por 30 minutos. Se montó un capilar de sílice fundida de 60.2 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva con un diámetro interno de 75 μm . Durante el análisis la temperatura fue mantenida a 25 °C.

3.7 Método de lavado

Para eliminar cualquier impureza o sustancia adsorbida en la parte interna del capilar, fue necesario implementar la siguiente técnica de lavado: Pasar NaOH 1.0 M mediante presión hidrodinámica de 35 psi a temperatura de 40 °C por 20 minutos, posteriormente NaOH 0.1 M a 25 °C por 20 minutos empleando 35 psi de presión. Finalmente, inyectar agua mili Q con presión hidrodinámica de 35 psi de presión a temperatura de 25 °C por 20 minutos al inicio de la jornada de análisis, esto es, diariamente entre cada cinco corridas.

Tabla 2. Condiciones óptimas de análisis por Electroforesis Capilar

Condiciones Electroforéticas	
Longitud total (cm)	60.2
Longitud efectiva (cm)	50
Diámetro interno (μm)	75
Material del capilar de trabajo	Sílice fundida
Temperatura del capilar durante el análisis ($^{\circ}\text{C}$)	24
Solución amortiguadora	Tetraborato de sodio $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 20 mM pH 9.3
Voltaje (kV)	25
Tipo de inyección	Hidrodinámica
Parámetros de inyección (Presión/Tiempo)	0.5 psi/ 5 s
Longitud de onda de análisis (nm)	260

4 RESULTADOS Y DISCUSION

El desarrollo de un método analítico consta de etapas, que permiten el monitoreo de cierta molécula de interés, como son el establecimiento de las condiciones de análisis, el tratamiento de la muestra que haga más sensible y específica la señal debida al analito, la medición de la señal procedente de la muestra, la adquisición de datos y el tratamiento de estos.²⁵

En la mayoría de las metodologías analíticas el tratamiento de la muestra corresponde al conjunto de procesos que permiten la detección del analito por la técnica a emplear.

En electroforesis capilar, se establecen varios parámetros tales como las dimensiones de los capilares (longitud y diámetro interno), el voltaje, la fuerza iónica y el pH, para obtener una resolución y separación adecuadas. Se deben evitar los cambios de temperatura que puedan afectar la viscosidad de la solución amortiguadora y, a su vez, influir tanto sobre el Flujo electrosmótico como sobre las movilidades de los analitos.²⁶

4.1 Condiciones de análisis

4.1.1 Selección de la longitud de onda

Para poder fijar la longitud de onda de análisis y conocer los tiempos de migración, se realizaron barridos, empleando una solución estándar de NAD, NADP, NADH y NADPH (1.5 mM). Los resultados mostraron que NAD⁺ presenta un máximo de absorción a 253 nm y tiempo de migración de 4.34 min (Fig. 3A); NADH absorbe a 255 nm y aparece al minuto 5.04 (Fig. 3B). En el caso de las formas fosforiladas, NADP⁺ presentó un máximo de absorción a 254 nm y tiempo de migración de 5.1 min (Fig. 3C) y el NADPH tiene un tiempo de migración de 5.87 min y máximo de absorción de 255 nm (Fig. 3D). Estableciendo así, la longitud de onda bajo las condiciones de trabajo similares a las ya reportadas para los nucleótidos de piridina (260 nm).²⁷

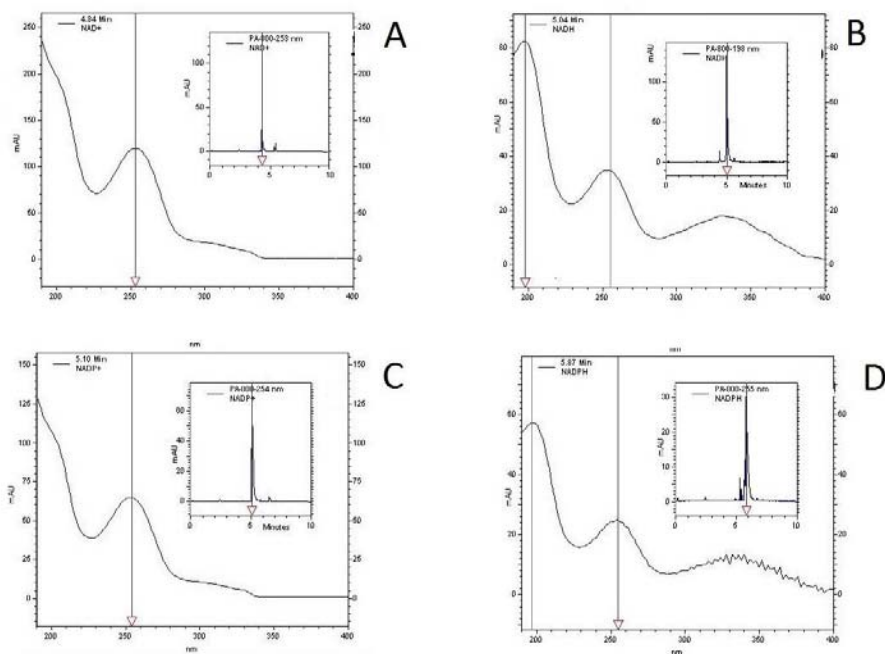


Figura 8. Espectros de absorción y electroferogramas de los cofactores de Nicotinamida. NAD (A), NADH (B), NADP (C) y NADPH (D).

4.1.2 Solución amortiguadora

4.1.2.1 Naturaleza

Para seleccionar la solución amortiguadora que se debe de utilizar, es importante conocer el intervalo de pH de trabajo (aquel en el que la magnitud de ionización de los analitos es alta, lo que permite una buena separación del compuesto de estudio de cualquier interferente) ya que eso permitirá una buena capacidad de amortiguamiento por parte de la solución al poseer un pka cercano al pH de trabajo.

Otras características que debe tener el amortiguador son: baja movilidad para minimizar la corriente, baja absorción a la longitud de onda de detección y que cuente con un pH relativamente alto ($\text{pH} \geq 7$) para generar la presencia del flujo electrosmótico y mantener a los grupos silanol activos.

Tabla 3. Soluciones amortiguadoras empleadas

Solución Amortiguadora	Intervalo útil de pH	Pka
Boratos	8.2-10.2	9.2
Fosfatos	5.0-7.0	6.0
Tris	7.06-9.06	8.06

Por ello, se probaron tres amortiguadores (Tabla 3), para seleccionar uno que cubriera las características ya mencionadas. Los mejores resultados (Figura 8) se observaron cuando se empleó la solución amortiguadora de boratos, ya que no absorbe a la longitud de onda de análisis. Así mismo se aprecia que la solución amortiguadora TRIS (pka 8.06) al ser un buffer orgánico, tiende a absorber en el rango UV dificultando la detección de los analitos. Al realizar una corrida empleando amortiguador de fosfatos pH 8.6, no se aprecian adecuadamente las señales de los nucleótidos de piridina, más bien se confunden con ruido espectrofotométrico.

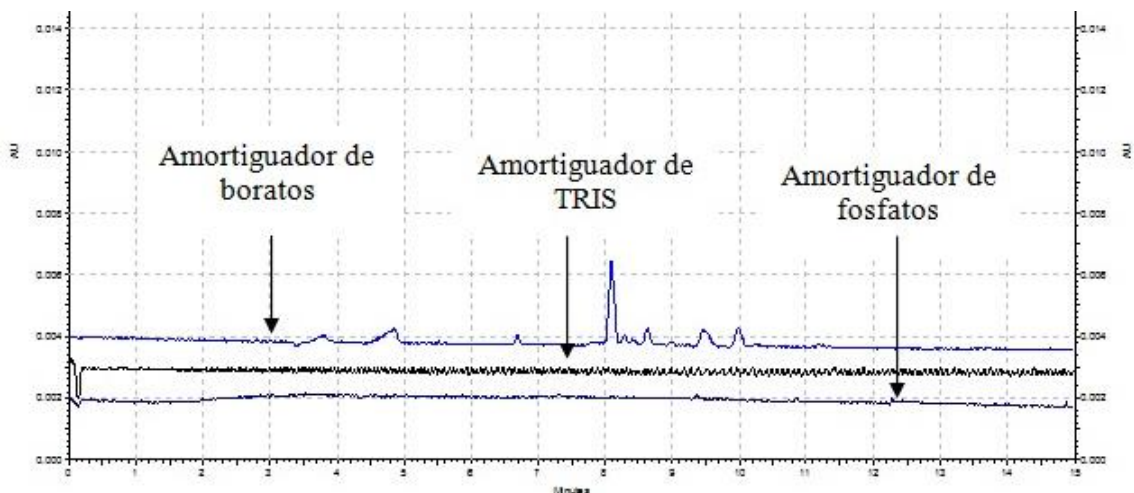


Figura 9. Electroferograma de comparación de resultados empleando tres buffer de corrida diferente.

Alivisatos y colaboradores²⁸ explican que el fosfato interacciona con la forma reducida de las coenzimas en el anillo de piridina, formando un aducto que cataliza la descomposición de las mismas (Figura 10).

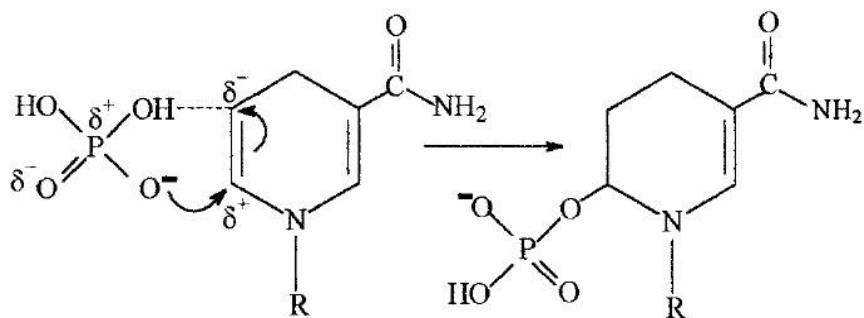


Figura 10. Formación del aducto entre el grupo fosfato y el anillo de piridina de las formas reducidas NADH y NADPH.

4.1.2.2 Evaluación del pH de separación

El pH tiene la importante función dentro del análisis por electroforesis capilar de determinar la magnitud de ionización en compuestos que cuentan con propiedades básicas y ácidas.

Una vez seleccionado el amortiguador de corrida, se varió el pH +/-0.5 del valor de su pka (9.2) a una solución amortiguadora de boratos 10 mM. Los resultados mostraron una mejor resolución a pH 9.7 que a 8.7 (Figura 11).

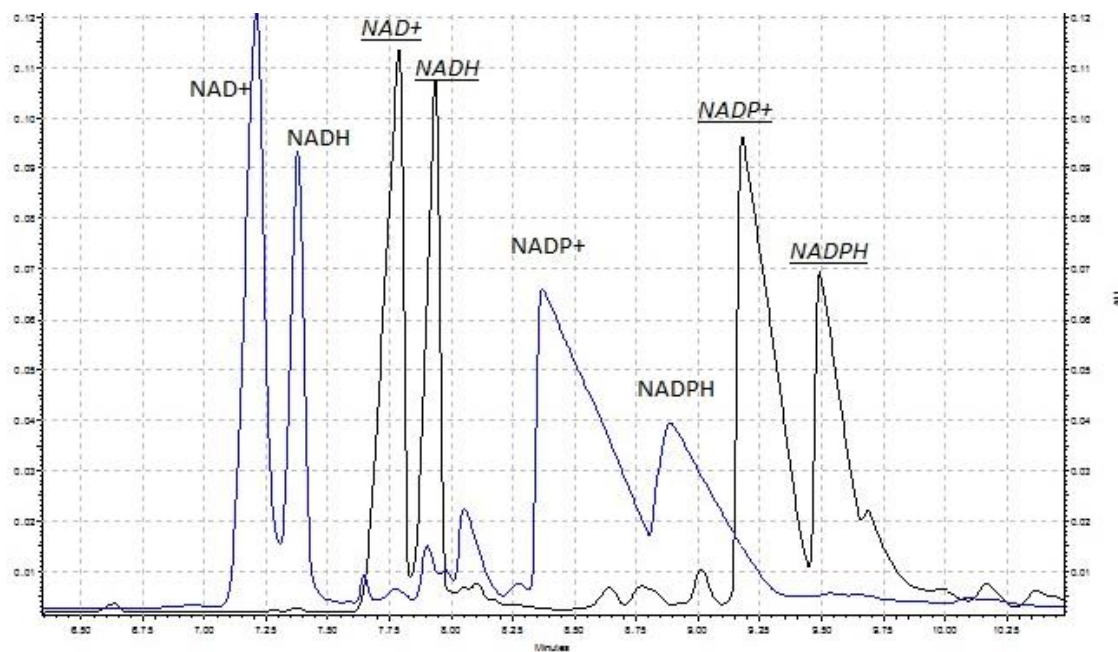


Figura 11. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μ M empleando buffer de boratos pH 8.7 (azul) y pH 9.7 (negro).

4.1.2.3 Concentración de la solución amortiguadora

Se evaluaron dos concentraciones, 20 y 30 mM del amortiguador de boratos, pH 9.7. A medida que la fuerza iónica de la solución amortiguadora aumenta, se incrementa la intensidad de corriente y, consecuentemente, la producción de calor, la cual afecta directamente la viscosidad del medio y los resultados en cuanto a tiempo de migración de los analitos no son reproducibles. (Figura 12).

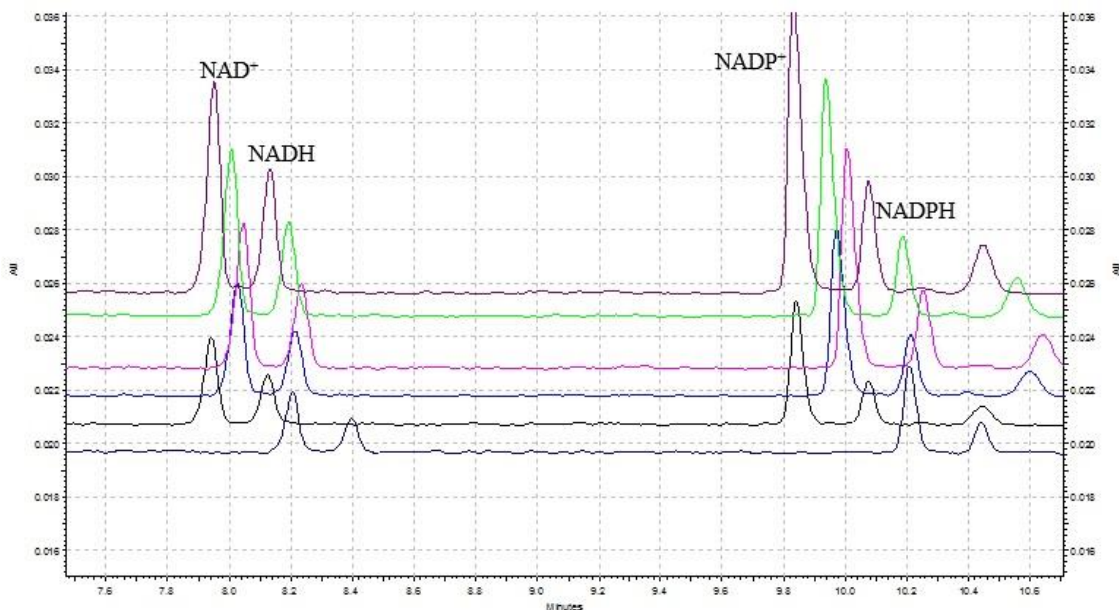


Figura 12. Electroferograma de una mezcla de estándares de coenzimas (75 μ M) empleando solución amortiguadora de boratos 30 mM pH 9.7

Es por ello, que se elige emplear solución amortiguadora de boratos 20 mM, debido a que la separación mejora, el aumento de corriente no es muy alto, por lo que la generación de calor (Calor de Joule)²⁹ es menor y los resultados son reproducibles (Figura 13).

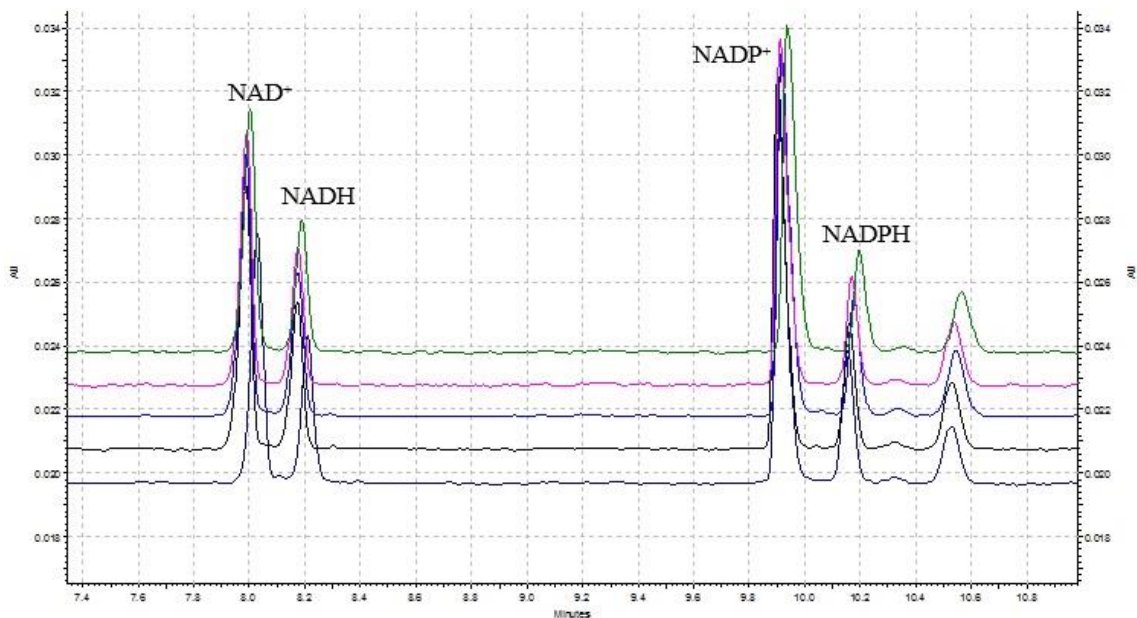


Figura 13. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μ M empleando amortiguador de boratos 20 mM, pH 9.7.

4.1.3 Voltaje

En este caso, al emplear una solución de tetraborato de sodio a una concentración de 20 mM pH 9.7, la corriente que genera debe ser cuidada al momento de aplicar voltajes altos. Para este estudio se probaron tres voltajes diferentes (20, 25 y 30 kV) con el fin de encontrar el que permitiera una separación adecuada de los analitos y una corriente estable y soportable para el equipo. Cuando se aplican 30 kV, (Figura 14) la corriente (en azul) no es estable y tiende a aumentar, y no se logra una adecuada separación.

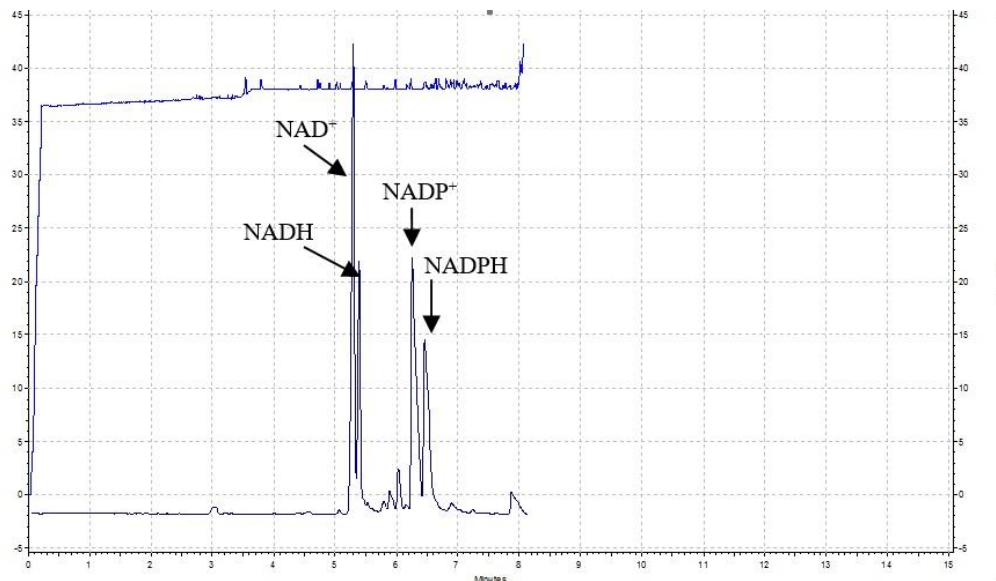


Figura 14. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μ M empleando amortiguador de boratos 20 mM pH 9.7 empleando 30 kV.

Por el contrario, cuando se decide disminuir el voltaje a 20 kV, la corriente es constante, sin embargo la separación de los analitos en la línea base no es la más adecuada (Figura 15).

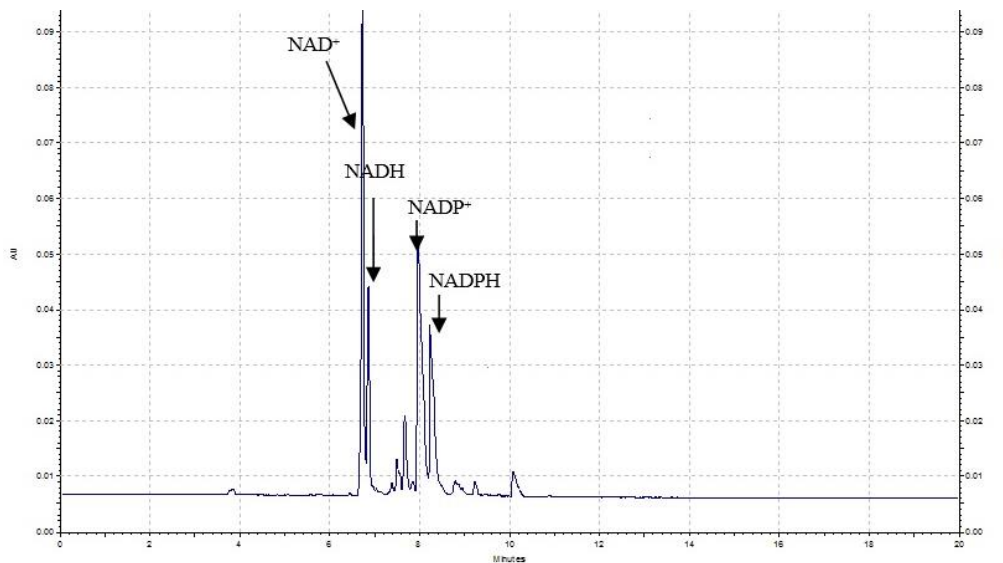


Figura 15. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μ M empleando amortiguador de boratos 20 mM pH 9.7 empleando 20 kV.

Al aplicar 25 kV, la corriente generada es de 174 μ A, con lo cual se logra una separación adecuada sin llegar al valor límite de corriente del equipo (300 μ A) ProteomeLab PA800 de Beckman Coulter, evitando la generación de calor u otros inconvenientes debido a la variación de corriente. Por lo que el voltaje de trabajo es 25 kV (Figura 16.).

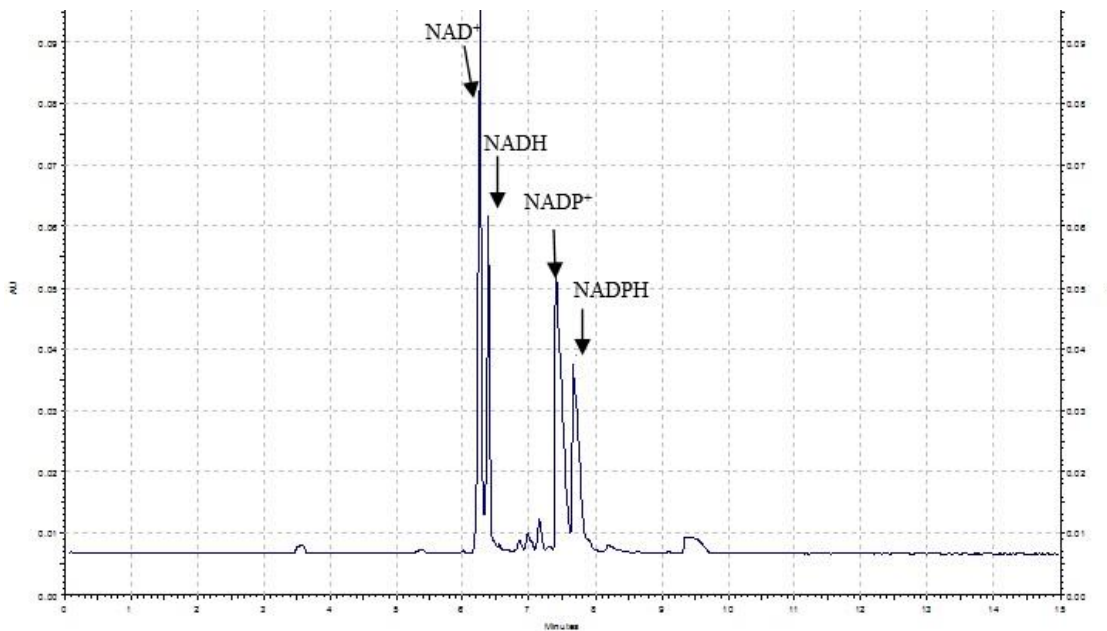


Figura 16. Electroferograma de mezcla de estándares de coenzimas 75 μ M empleando amortiguador de boratos 20 mM pH 9.7 empleando 25 kV.

4.1.4 Introducción de la muestra

Debido a la naturaleza de la muestra a analizar, se decide introducirla hidrodinámicamente, por 5 s a una presión de 0.5 psi. No se plantea introducir más muestra para evitar que los picos se ensanchen y se pierda resolución. Empleando estas condiciones se optimizará el tratamiento de la muestra y se evaluará si es pertinente modificar estas condiciones.

4.2 Tratamiento de la muestra

4.2.1 Eliminación de proteínas

Al realizar las determinaciones de coenzimas en tejido hepático, el principal interferente es la presencia de proteínas, para ello, existen diferentes métodos que permiten su eliminación, tales como salting out, precipitación isoeléctrica y precipitación con solventes.

4.2.1.1 Precipitación isoeléctrica

Con el conocimiento previo que las proteínas por su naturaleza anfotérica presentan una carga neta negativa a pH altos y una carga neta positiva a pH bajos. Existe un pH llamado pH Isoeléctrico al cual la carga neta de la proteína es cero. A este pH la molécula es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico, por lo que precipita. Los resultados demostraron que el aislamiento de las coenzimas de tejido hepático con NaOH 0.01 N (p/v 2 %) no es la adecuada, ya que no se aprecian señales para analizar debido a la posible degradación de las coenzimas oxidadas (NAD^+ y NADP^+) que son

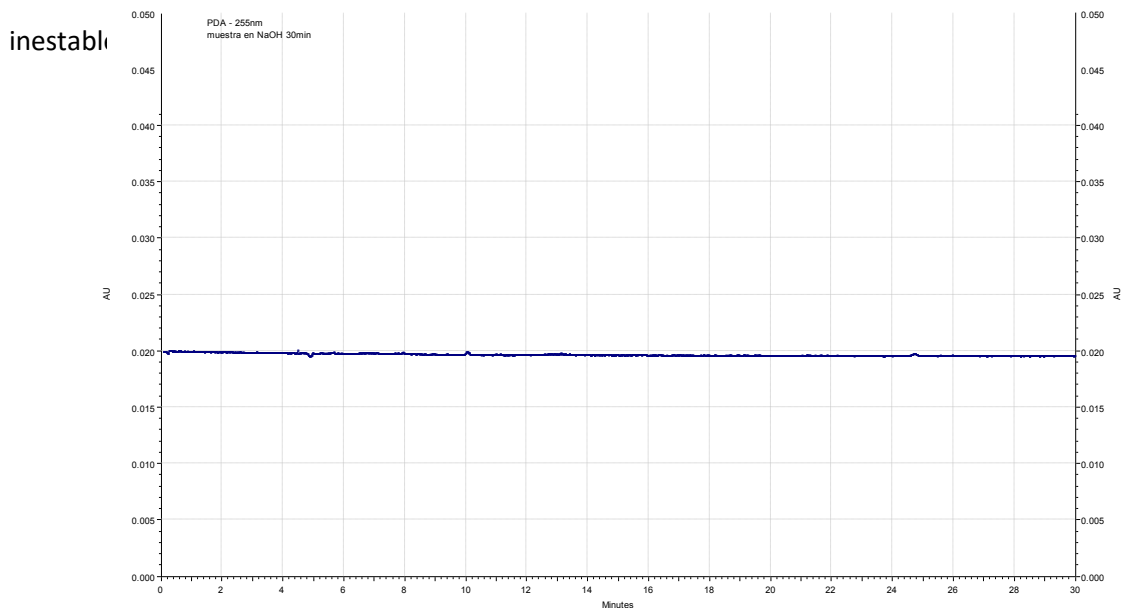


Figura 17. Electroferograma de coenzimas extraídas de homogenizado hepático en NaOH 0.01 N.

Las muestras también fueron tratadas con diferentes ácidos, entre ellos: ácido metafosfórico, ácido 5-sulfosalicílico y ácido clorhídrico, sin embargo, las coenzimas reducidas (NADH y NADPH) son inestables a condiciones ácidas, debido a que el anillo reducido se protona en el C-5 y entonces, moléculas de H₂O u otras especies nucleofílicas se adicionan a la posición 6 del anillo de piridina, generando así, la apertura del anillo a ambos lados del nitrógeno, por lo que su empleo para la extracción de coenzimas no asegura un aislamiento adecuado e incluso propicia la degradación de los

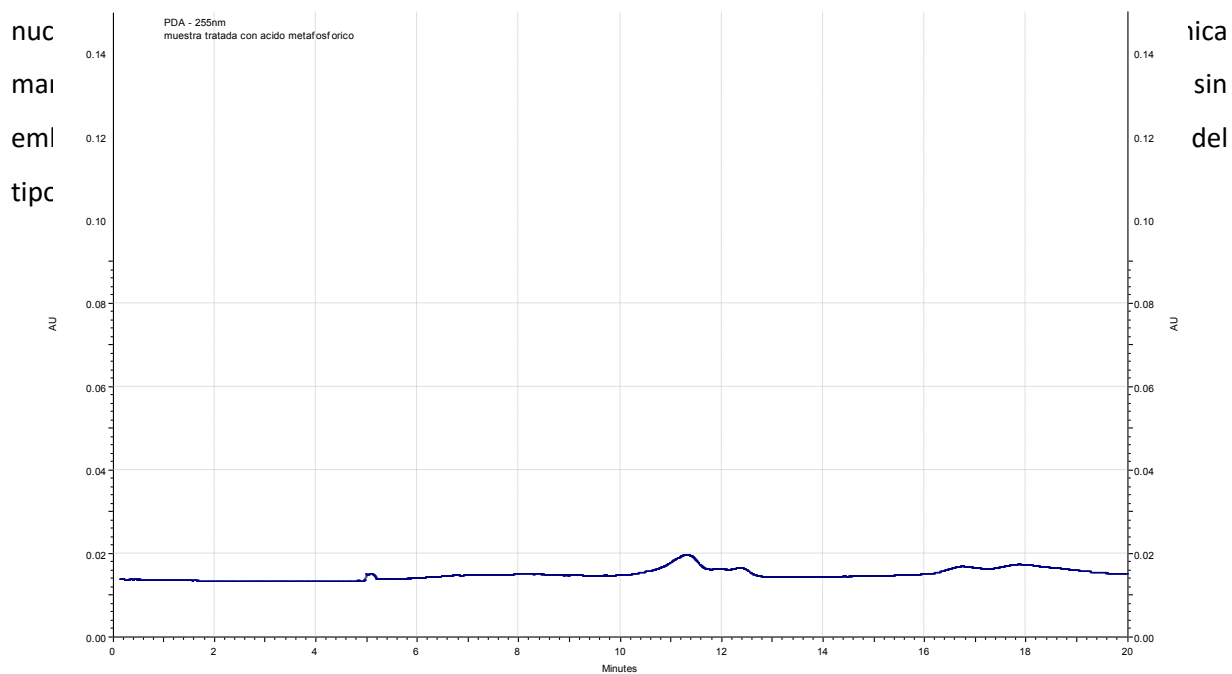


Figura 18. Electroferograma de coenzimas extraídas de homogenizado hepático en ácido metafosfórico.

4.2.1.2 Precipitación con solventes orgánicos

Para este fin se utilizó etanol para producir agregados de moléculas proteicas que tiendan a precipitar, debido a una diferencia decreciente de la constante dieléctrica que el solvente presenta con respecto a la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en

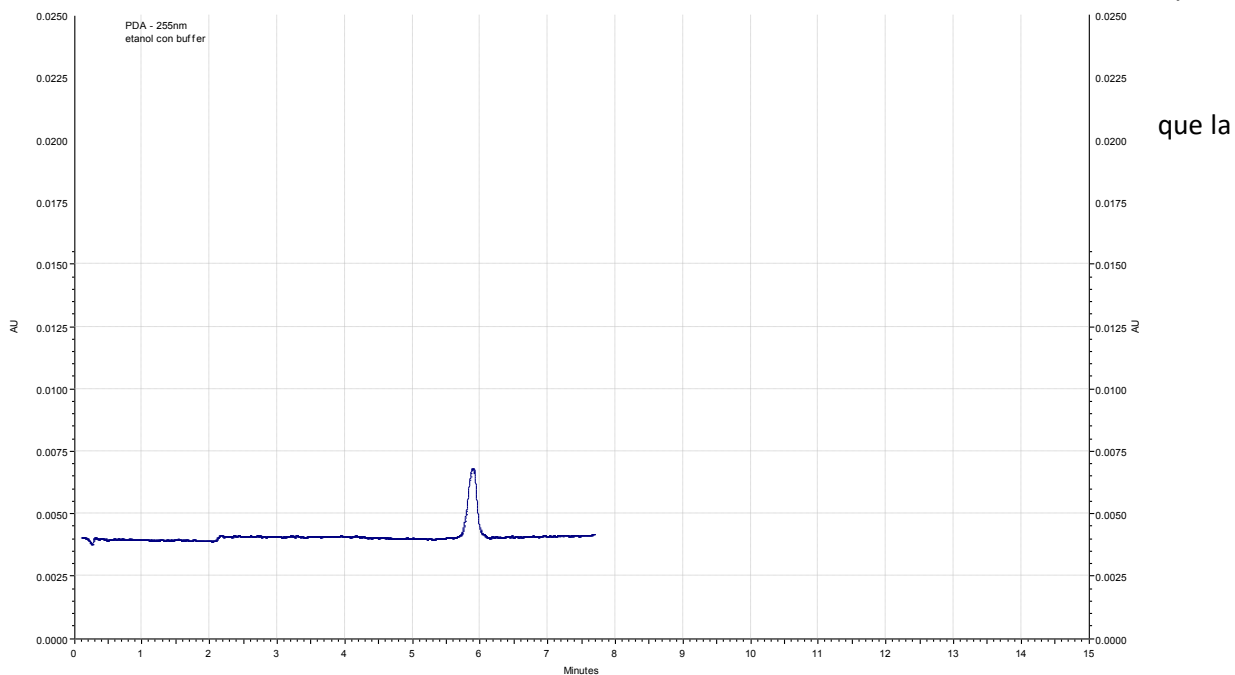


Figura 19. Electroferograma de coenzimas extraídas de homogenizado hepático en etanol (p/v 2 %) y resuspendido en buffer de boratos 10 mM pH 9.7

Lo mismo ocurre cuando se utiliza cloroformo, la separación de los analitos a las condiciones impuestas no se lleva a cabo (Figura 20) y se observa una señal muy ruidosa.

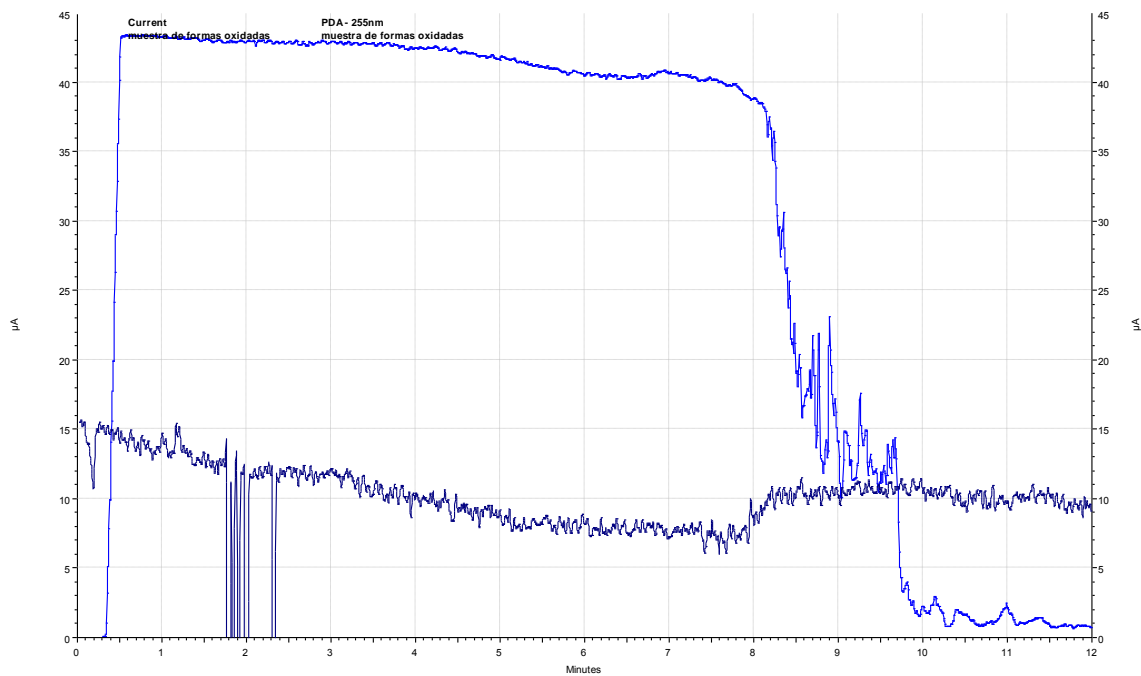


Figura 20. Electroferograma de coenzimas extraídas de homogenizado hepático en cloroformo (p/v 20 %).

4.2.1.3 Salting Out

El método *Salting Out* consiste en la adición de sales para eliminar el agua de la proteína hidratada, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de combinarse intermolecularmente. En la Figura 21 se pueden observar dos picos anchos que probablemente indiquen la mala separación entre sí de las coenzimas no fosforiladas (NADH/ NAD⁺) y fosforiladas (NADPH/NADP⁺) respectivamente. La línea base, por otro lado, se encuentra perturbada por la posible presencia de proteínas y péptidos que no fueron precipitados por la adición de amortiguador de boratos.

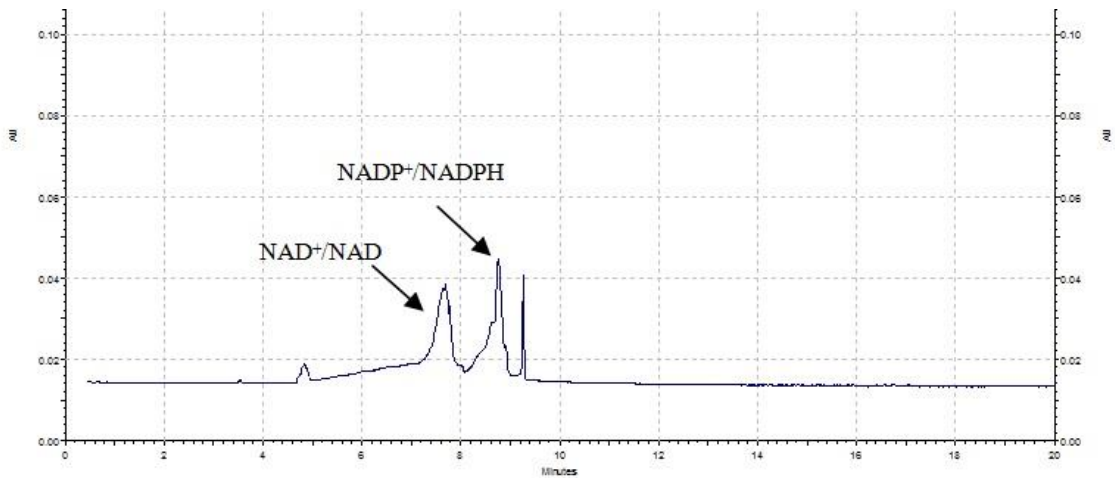


Figura 21. Electroferograma de coenzimas extraídas de tejido hepático con Tetraborato de sodio 0.005N pH 9.7

4.2.1.4 Desnaturalización

Se evaluó este tratamiento térmico, con el que se pretendió desnaturalizarlas rompiendo los puentes débiles de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas a causa del aumento en la energía cinética de las moléculas.

La mayor parte de las proteínas experimentan el proceso de desnaturalización cuando se calienta por encima de 60 o 70 °C. Las formas reducidas NADH y NADPH mantienen su conformación bajo dicha condición, como se observa en la Figura 22.

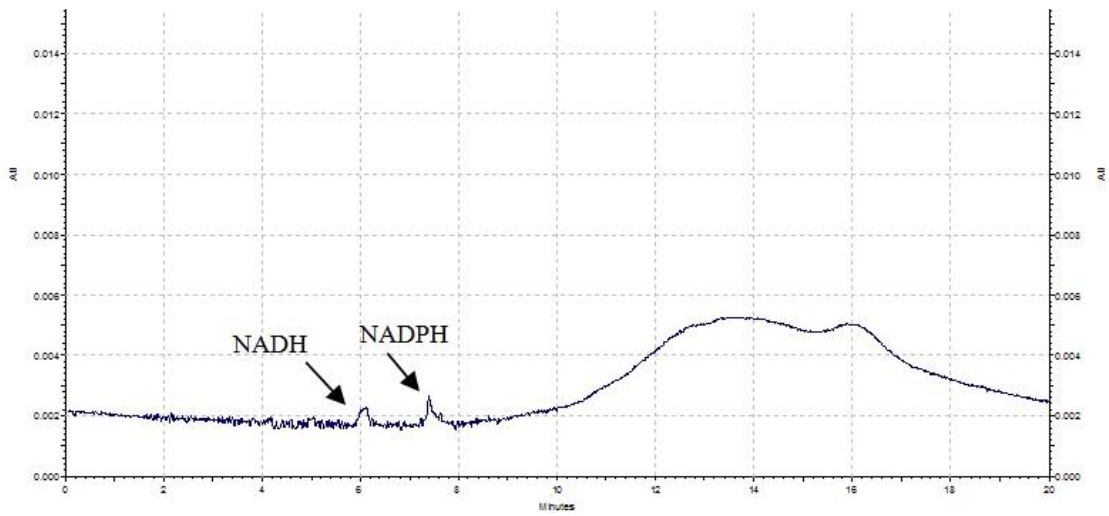


Figura 22. Electroferograma del aislamiento de las formas reducidas NADH y NADPH en hígado graso (10% p/V) después de ser sometidos a tratamiento térmico de 60 °C.

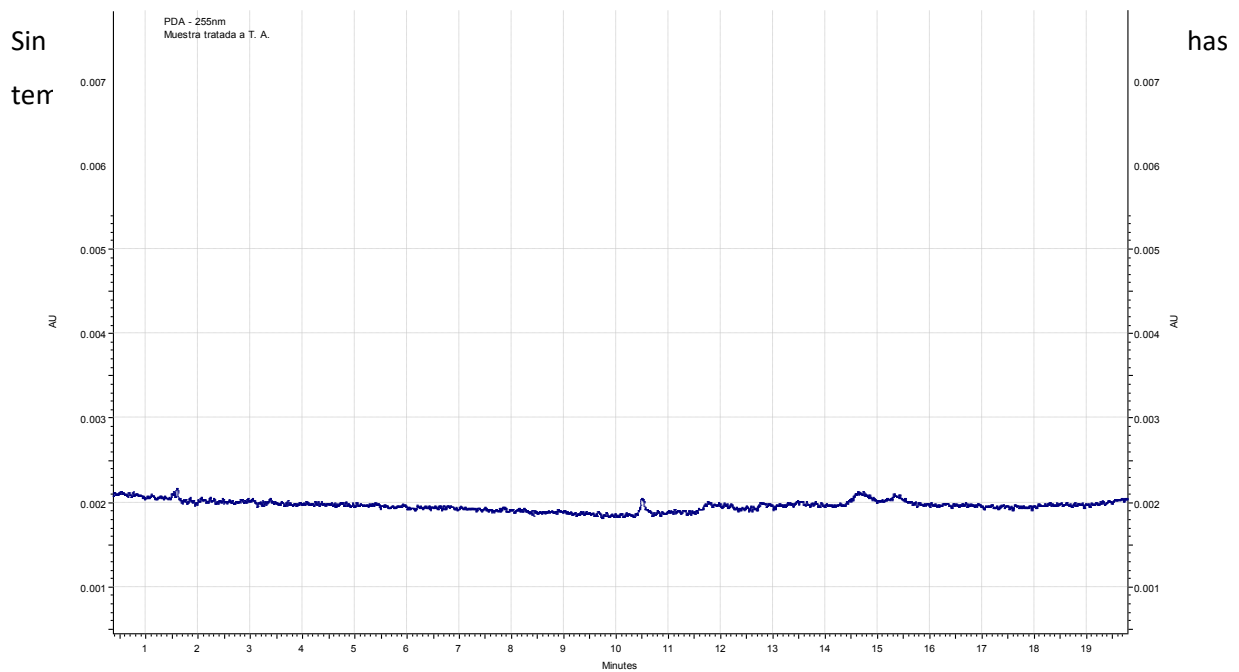


Figura 23. Electroferograma donde se observa el aislamiento de las formas oxidadas NAD⁺ y NADP⁺ en hígado graso después de ser sometidos a tratamiento térmico de 60 °C.

4.2.2 Conversión Enzimática

Como también es imprescindible el estudio de las formas oxidadas NAD^+ y NADP^+ , y el tratamiento térmico asegura la remoción de los interferentes en la muestra (comprobado por el método de Bradford³⁰), se optó por realizar una conversión enzimática, en la que con ayuda de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, las formas oxidadas se convierten a reducidas (Figura 24), permitiendo así el monitoreo indirecto de NAD^+ y NADP^+ a través de sus formas reducidas correspondientes (NADH y NADPH) sin que se degraden debido al tratamiento térmico.

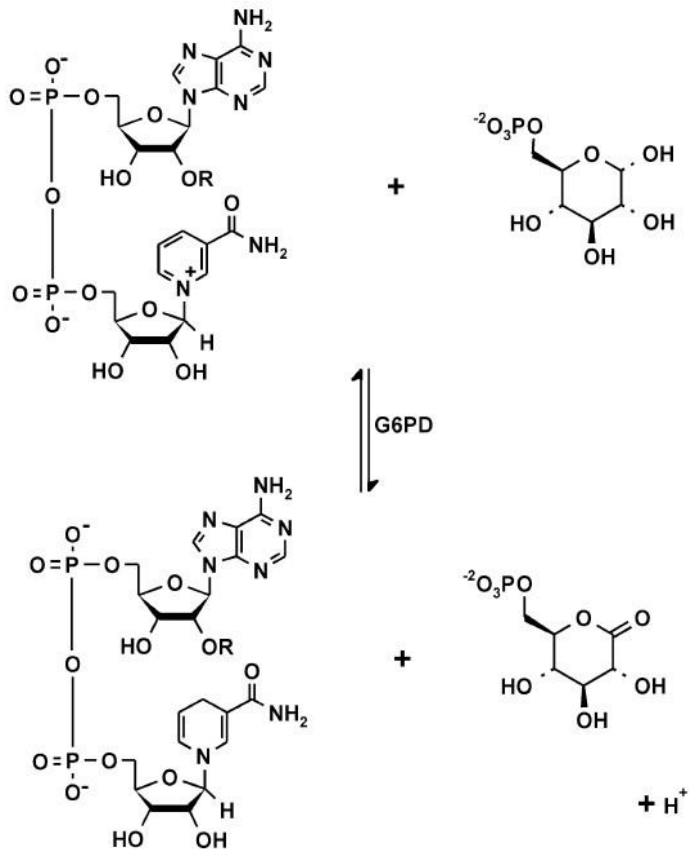


Figura 24. Reacción de NAD^+ ($\text{R}=\text{H}$) o NADP^+ ($\text{R}=\text{PO}_3^{-2}$) con glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) a la forma NADH ($\text{R}=\text{H}$) o NADPH ($\text{R}=\text{PO}_3^{-2}$), con 6-fosfogluconolactato.

La reacción enzimática fue realizada en estándares de coenzimas oxidadas para corroborar que dicha conversión se llevaba a cabo; mediante la comparación de las alturas de las señales obtenidas antes y después de la reacción ya mencionada, se sabe que la cantidad de coenzimas reducidas no es la misma que la de las oxidadas, sin embargo la conversión enzimática hasta el momento es la mejor alternativa para preservar la composición de las coenzimas oxidadas al ser sometidas a la precipitación de proteínas necesario para el monitoreo por EC. (Figura 25).

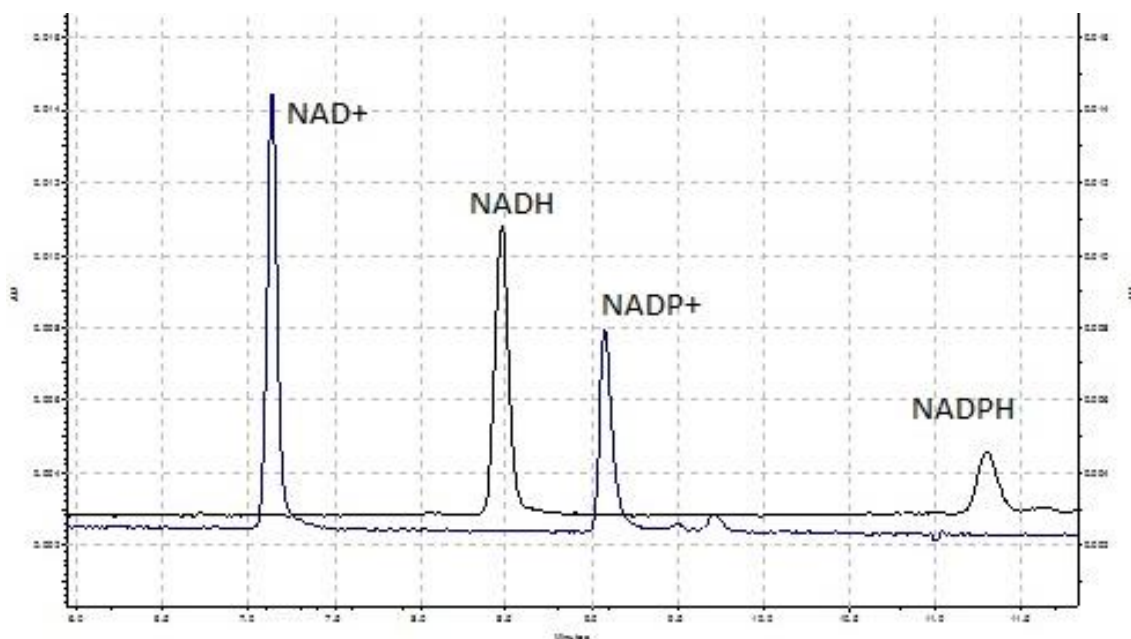


Figura 25. Electroferograma de la comparación de la intensidad de señal de los estándares antes (azul marino) y después de la conversión enzimática (negro).

4.2.2.1 Tiempo de reacción

Para conocer el tiempo óptimo de incubación para que la reacción enzimática se lleve a cabo en su totalidad, se realizó el mismo tratamiento de muestra, variando el tiempo de reacción a 15, 30 y 45 minutos.

Como se observa, a los 15 minutos, la reacción no se lleva a cabo completamente y a los 30 y 45 minutos, la intensidad de señal es la misma, por lo que el tiempo óptimo de incubación de la reacción es de 30 minutos ya que pasado este lapso, no existen cambios significativos (Figura 26).

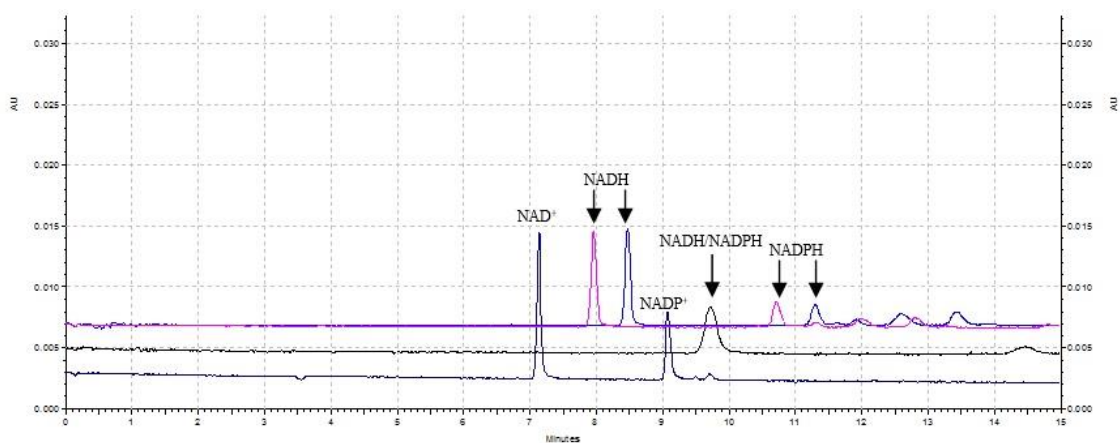


Figura 26. Electroferograma donde se compara a las formas oxidadas (NAD^+ y NADP^+) 1.3 mM (azul oscuro), y a las formas reducidas obtenidas después de la reacción enzimática a 15 min (negro), a 30 min (azul rey) y 45min (rosa).

4.2.2.2 Efecto de la temperatura

El tratamiento térmico, además de permitir la desnaturalización de proteínas, también facilita la inhibición de la reacción enzimática. Para ello, fue necesario conocer el tiempo al que la muestra sometida brinda el mejor aislamiento de los nucleótidos de piridina sin afectar ni modificar la estructura de los mismos. Los resultados demuestran una evidente degradación a 70 y 80 °C (azul y negro) favoreciendo la formación de nuevos picos que representan la generación de otros productos. A 60 °C (rosa) se logra un buen aislamiento de las coenzimas y una baja degradación (Figura 27).

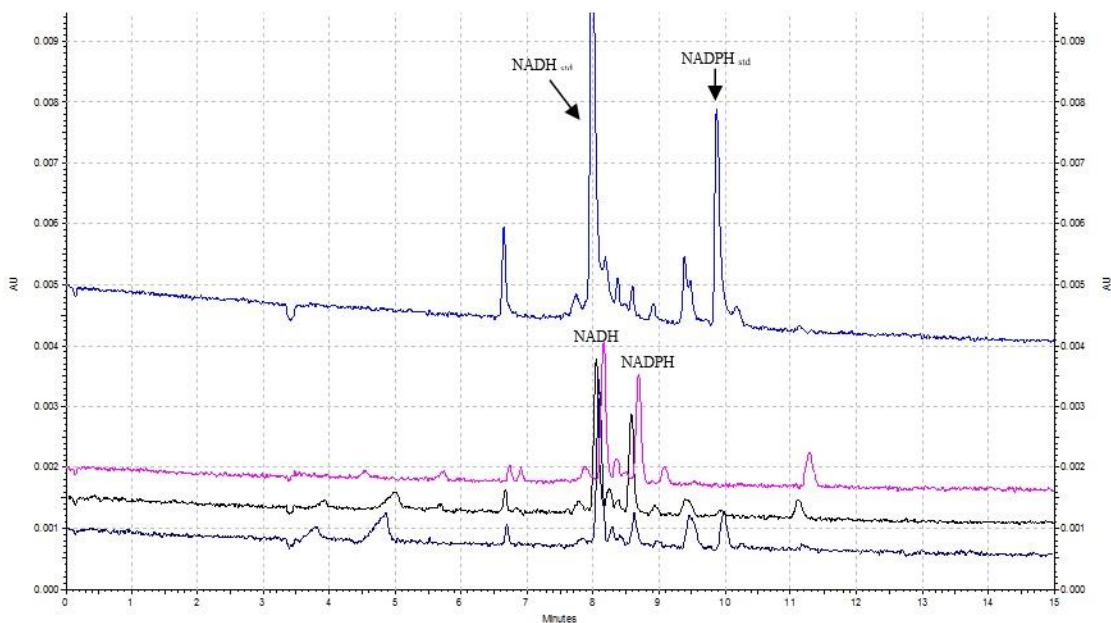


Figura 27. Electroferograma en el que se comparan estándares reducidos incubados por periodo de 1 h a 60 °C (rosa), 70°C (negro) y 80°C (azul) comparados con estándar de referencia (azul) 1.5 mM.

4.2.2.3 Cantidad de enzima

Se realizaron tres pruebas en las que se varió la cantidad de enzima agregada a la reacción para obtener la mayor conversión posible de las formas oxidadas (NAD^+ y NADP^+) a reducidas. Se adicionaron 2, 4 y 6 μL de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa hidratada con PBS pH 7.4 por separado a tres sistemas de cofactores oxidados 1.3 mM. Se determinó mediante la comparación de alturas de las señales que a pesar de que ocurre una mayor conversión de NAD^+ a NADH añadiendo 2 μL de G6PDH, es usando 4 μL cuando la mayor cantidad de NADP^+ se transforma a NADPH . La adición de 6 μL (azul rey) es descartado ya que la conversión es prácticamente la misma que al emplear 4 μL (Figura 28).

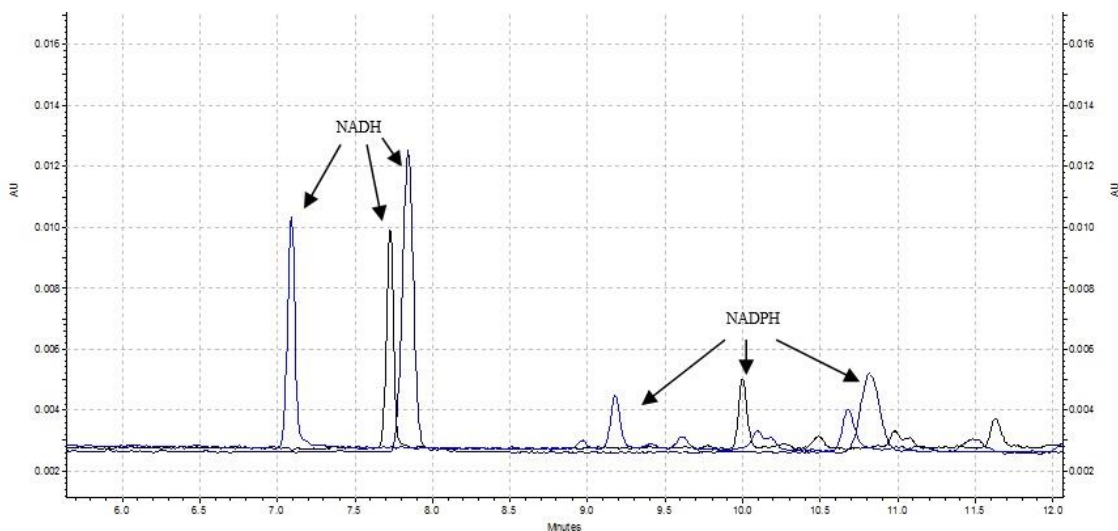


Figura 28. Electroferograma donde se compara la conversión de los nucleótidos de piridina en forma oxidada a reducida, empleando 2 μL (negro), 4 μL (azul marino) y 6 μL de enzima (azul rey).

Una vez establecidas las condiciones electroforéticas en estándares, el tratamiento de la muestra para la eliminación de interferentes y la conversión enzimática, se realizó el análisis preliminar en tejido hepático (20% p/v), en los que se obtuvieron resultados similares en hígado graso a los obtenidos en las soluciones estándar (Figura 29.).

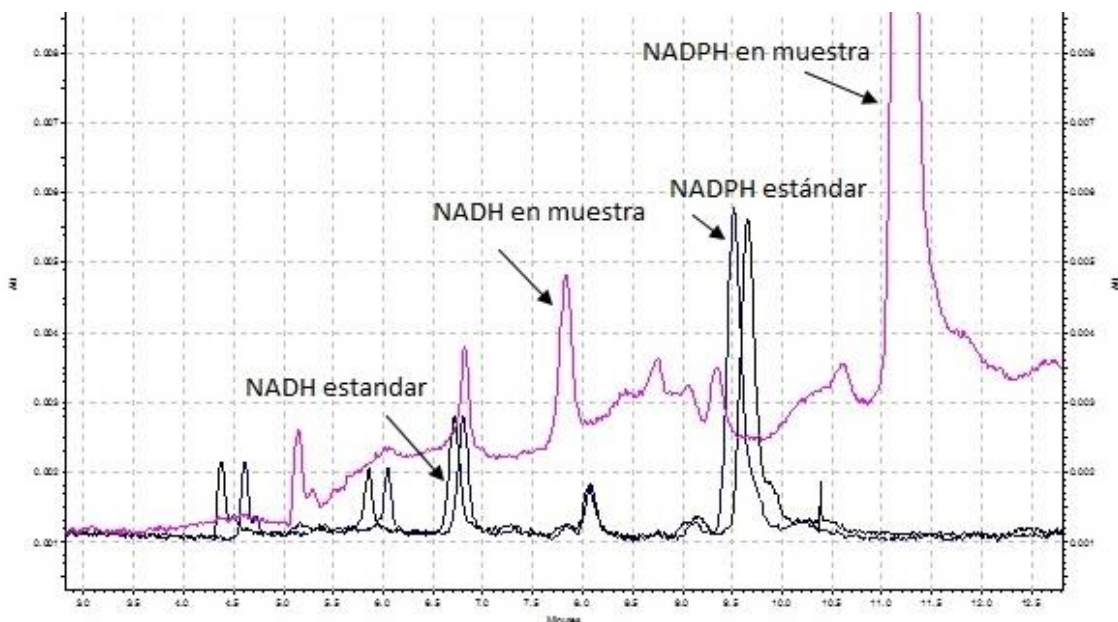


Figura 29. Electroferograma para soluciones estándar (negro y azul) y una muestra biológica (rosa) sometidos a tratamiento enzimático y eliminación de proteínas.

El tratamiento de la muestra, a su vez fue complementado por centrifugaciones, las cuáles propician la sedimentación de las proteínas ya desnaturalizadas a través del gradiente de densidad a una velocidad característica que es determinada por el peso de la partícula, densidad y forma, lo que permite el completo aislamiento de los nucleótidos de piridina.

4.3 Optimización de las condiciones electroforéticas con la muestra real

4.3.1 Concentración de la solución amortiguadora

Dada la complejidad de la muestra, el proceso de optimización de la separación se realiza directamente con muestras y empleando amortiguador de boratos a pH 9.1, a concentraciones de 15, 20 y 30 mM. Cuando se utiliza el amortiguador de boratos 15 mM se obtiene una corriente adecuada, pero se observa una mala separación de los analitos (círculo rojo) debido a señales inherentes a la muestra (Figura 30.).

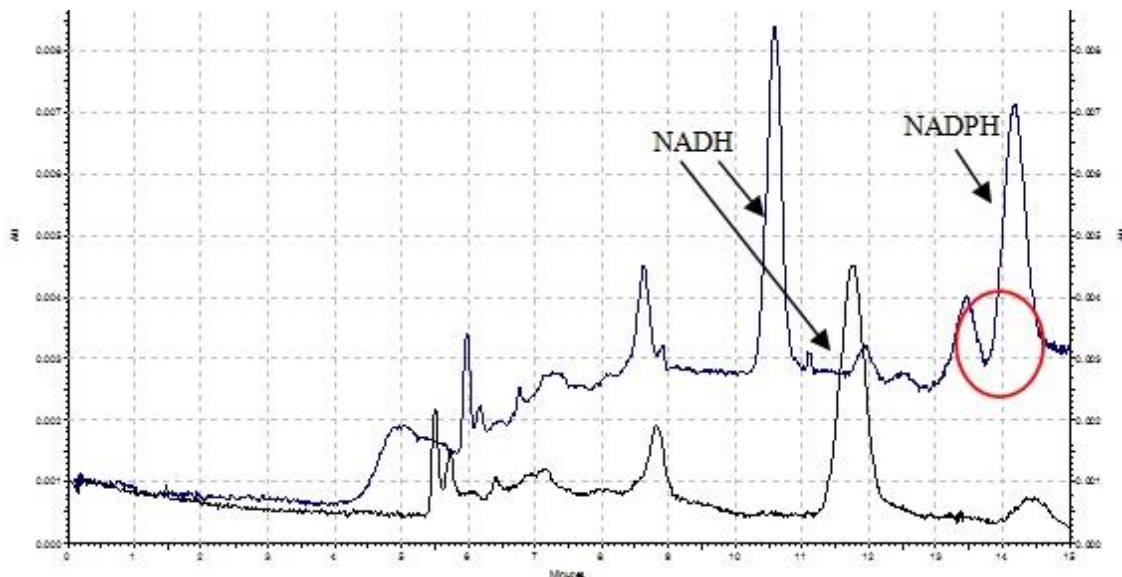


Figura 30. Electroferograma de muestra de hígado graso (p/v 20%) para el monitoreo de NAD^+ y NADP^+ de manera indirecta a través de NADH (T_m 8 min) y NADPH (T_m 12 min) empleando buffer de boratos 15 mM pH 9.1.

Por otro lado, la separación de las coenzimas de estudio mejora cuando se emplea el amortiguador de boratos a una concentración de 20mM (Figura 31.).

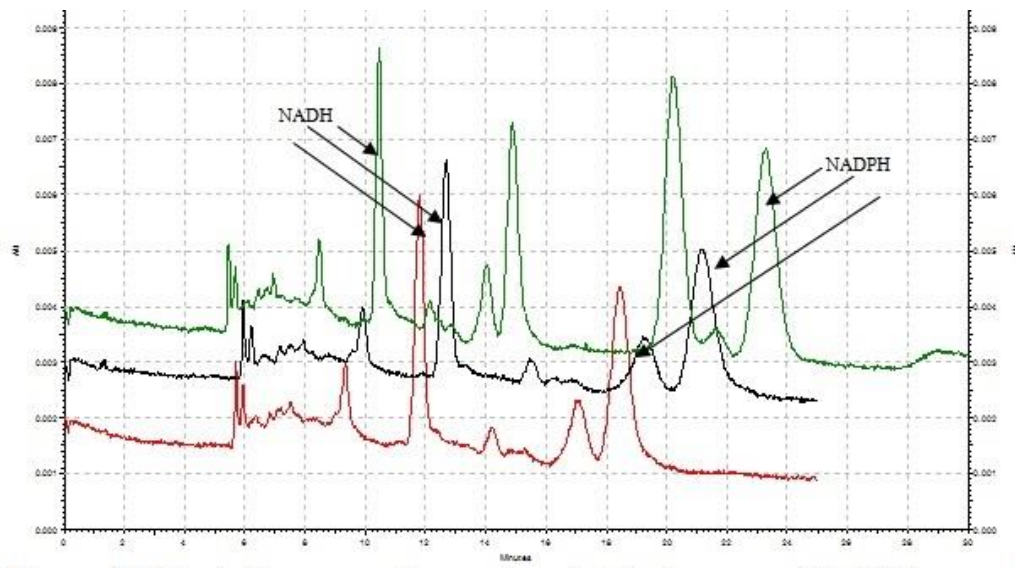


Figura 31. Electroferograma de muestra de hígado graso (p/v 20%) para el monitoreo de NAD^+ y NADP^+ de manera indirecta a través de NADH y NADPH empleando buffer de boratos 20 mM pH 9.1.

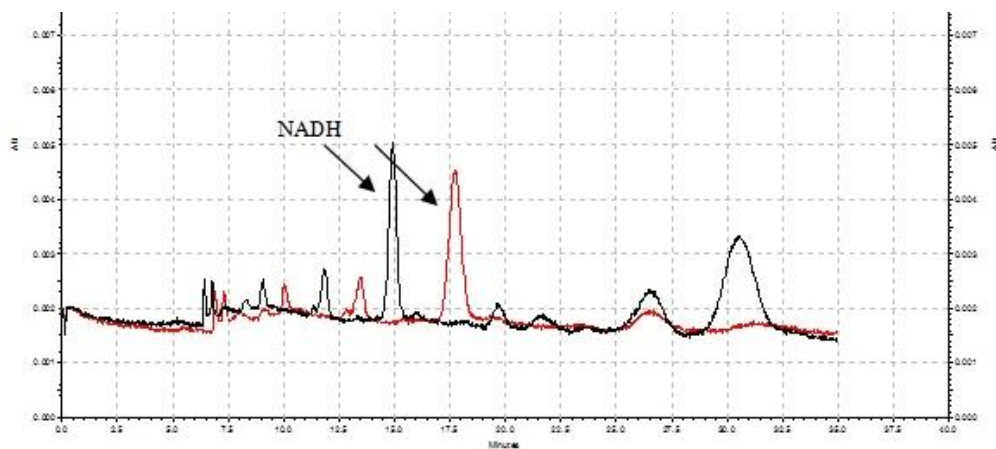


Figura 32. Electroferograma de muestra de hígado graso (p/v 20%) para el monitoreo de NAD^+ y NADP^+ de manera indirecta a través de NADH (T_m 8min) y NADPH (T_m 12min) empleando buffer de boratos 30 mM pH 9.1.

Al aumentar la concentración del buffer a 30 mM, la elevada concentración de iones libres propicia la generación de una corriente muy elevada, la cual calienta el sistema y afecta la reproducibilidad de los resultados (Figura 32), por lo que emplear concentraciones mayores de 20 mM queda descartado.

4.3.2 pH de la solución amortiguadora

Una vez seleccionada la concentración de la solución amortiguadora de boratos (20 mM), se realizaron ensayos individuales a pH 9.1, 9.3 y 9.5, con el propósito de monitorear NADH y NADPH en muestras de hígado graso, para elegir el valor de pH que permita obtener una mejor separación, resolución y altura de picos tanto en las determinaciones directas de NADH y NADPH e indirectas de NAD^+ y NADP^+

Se puede apreciar que a pH 9.1 tanto en la determinación directa (Figura 32) como indirecta (Figura 33) se observa empalme de señales, no lográndose una adecuada separación de los nucleótidos de piridina.

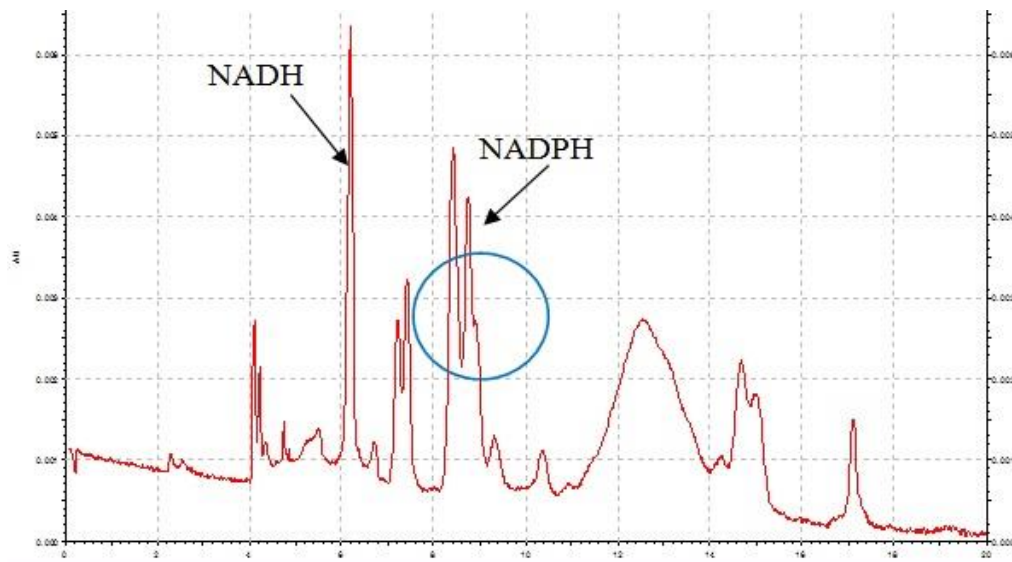


Figura 33. Electroferograma de la determinación directa de NADH y NADPH en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM, pH 9.1 y detección a 260nm.

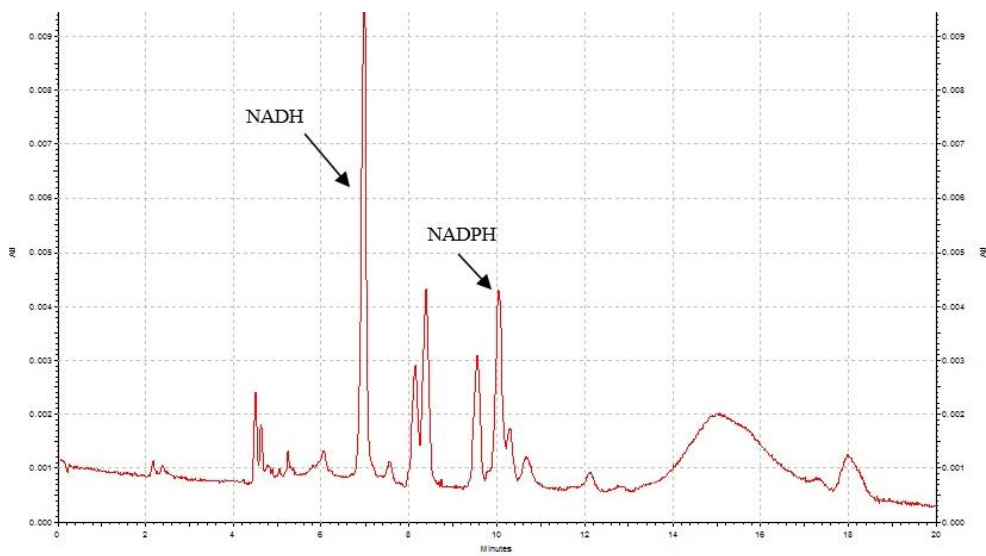


Figura 34. Electroferograma de la determinación indirecta de NAD^+ y NADP^+ en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM pH 9.1 y detección a 260nm.

A pH 9.5, la separación de los analitos de interés tampoco se lleva a cabo de manera adecuada ni en la determinación directa (Figura 34) o en la indirecta (Figura 35).

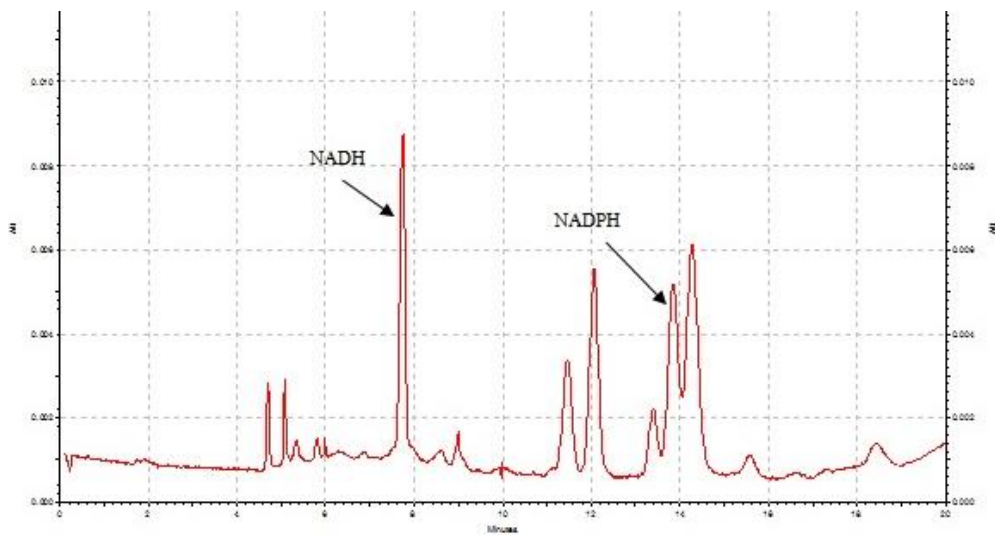


Figura 35. Electroferograma de la determinación directa de NADH y NADPH en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM pH 9.5 a 260nm.

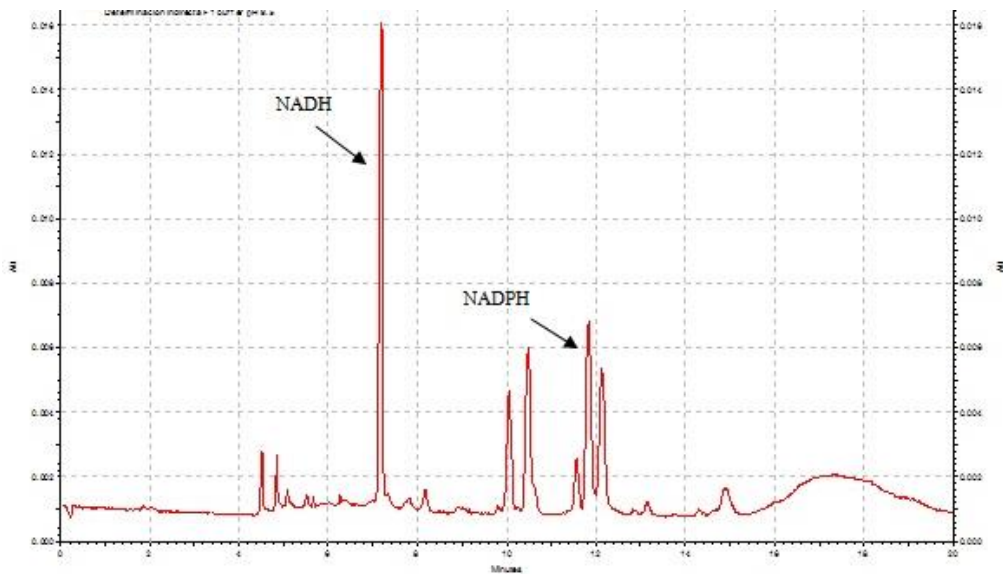


Figura 36. Electroferograma de la determinación indirecta de NAD^+ y NADP^+ en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM pH 9.5 a 260nm.

Cuando la solución de boratos es ajustada a pH 9.3, la separación de los picos correspondientes a los nucleótidos de piridina es adecuada, ya que son separados de los demás picos interferentes, tanto en la determinación directa de NADH y NADPH (Figura 36) e indirecta de NAD^+ y NADP^+ (Figura 37).

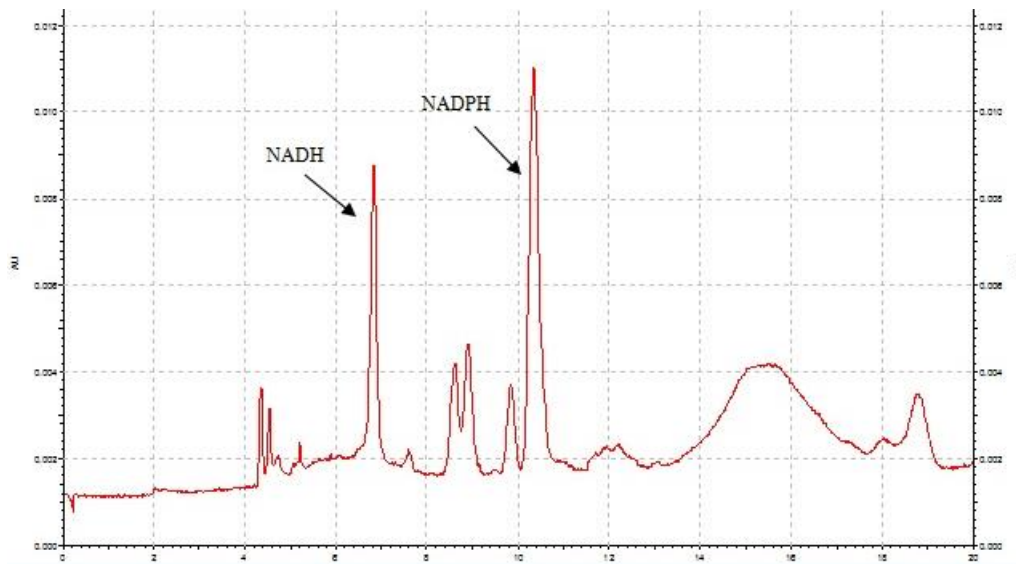


Figura 37. Electroferograma de la determinación directa de NADH y NADPH en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM pH 9.3 a 260nm.

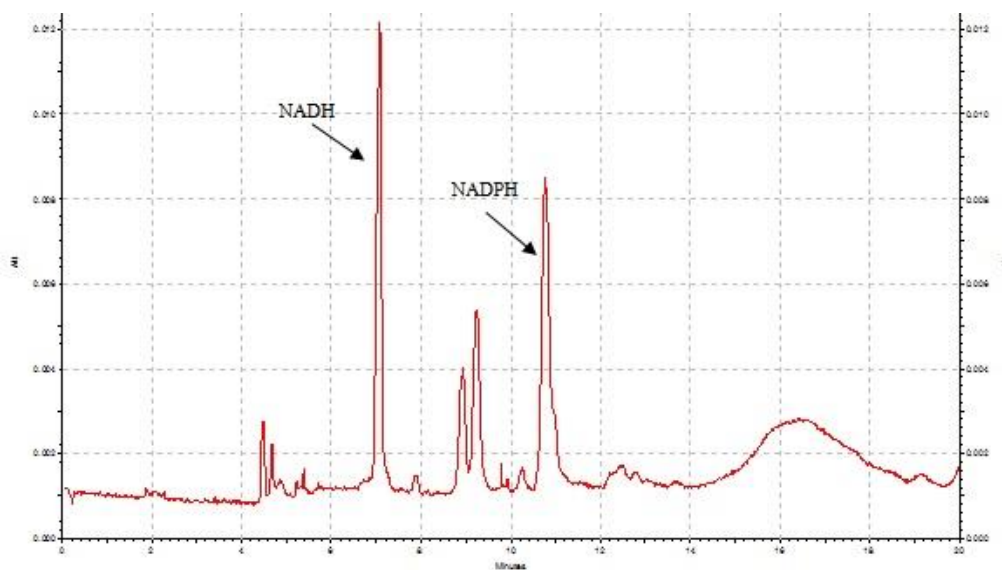


Figura 38. Electroferograma de la determinación indirecta de NAD⁺ y NADP⁺ en hígado graso empleando buffer de boratos 20mM, pH 9.3 y detección a 260nm.

4.3.3 Lavado del capilar

Uno de los factores que generalmente presenta los mayores problemas en electroforesis capilar, es la reproducibilidad en los tiempos de migración. El factor más importante a controlar para tener una buena reproducibilidad es el lavado y acondicionamiento del capilar. Dado que la muestra real, contiene una cantidad desconocida de componentes, y algunos de ellos pueden adsorberse en la pared del capilar, modificándola y consecuentemente afectando el análisis, es de vital importancia asegurar que se recupere, antes de cada análisis, la superficie del capilar. Por ello es importante establecer la adecuada rutina de lavado.

El empleo de NaOH 1.0 M en el método de lavado tiene la intención de remover compuestos adsorbidos en la pared interna del capilar, como componentes de la muestra, y activar la superficie del mismo mediante la desprotonación de los grupos silanol, para que la eliminación de cualquier residuo sea más efectiva, a éste paso se le suma también un aumento de temperatura a 40 °C, además de la alta presión (35 psi) con la que se introduce la solución.

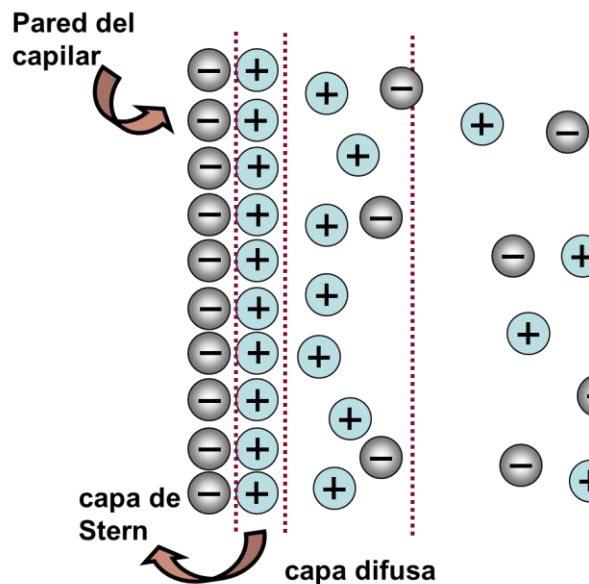


Figura 39. Superficie del capilar y desprotonación de los grupos silanol mediante el empleo de NaOH.

Para disipar el calor, pero mantener activos a los grupos silanol, el capilar es lavado con NaOH 0.1 M a 25 °C. Posterior a este paso, se pasa H₂O desionizada para eliminar el NaOH (20 minutos/ 35 psi).

Finalmente, para el acondicionamiento del capilar, se hace pasar a través de él la solución amortiguadora de trabajo. Siendo ésta última acción la primera en realizarse antes de cada análisis, ya que eso permitirá una superficie homogénea y limpia para llevar a cabo el proceso de separación electroforético.

4.4 Determinación de NAD^+ , NADH , NADP^+ y NADPH

Se realizó una curva de calibración con el propósito de conocer las concentraciones de las coenzimas en tejido hepático sin embargo, los estándares son poco estables y tienden a degradarse en el tiempo de análisis por lo que esta opción fue descartada.

Se optó por emplear un estándar interno con el que al conocer su concentración y mediante el cálculo del recobro, se pudiese llevar a cabo la cuantificación. No obstante, las condiciones de tratamiento de muestra como lo es la precipitación de proteínas para el aislamiento de los analitos fueron limitantes ya que los estándares internos propuestos (AMP , ADP , ATP y FADH) que como bien se sabe deben tener propiedades o comportamiento similar a los compuestos en estudio, no soportan el tratamiento térmico y tienden a degradarse.

Para estos fines y por el momento, la comparación de alturas entre NADH/NAD^+ y $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ brindan una noción de la relación que existe entre ellas en condiciones normales encontradas en los animales CONTROL y en condiciones alteradas encontradas en los animales con HÍGADO GRASO.

4.5 Aplicabilidad del Método Desarrollado

Una vez encontradas las condiciones óptimas, se analizaron 16 muestras de ratas, 8 con hígado graso y 8 control a fin de evaluar la aplicabilidad de la metodología desarrollada.

Tabla 2. Promedios obtenidos de la relación de NADH/ NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ de 16 muestras de ratas de las cuales 8 son control y 8 con hígado graso.

	NADH/NAD ⁺	NADPH/NADP ⁺
CONTROL	1.7779	0.9571
HIGADO GRASO	0.8403	1.2461

Como se observa en la Tabla 4, la relación NADPH/NADP⁺ en tejido hepático incrementa en condiciones de hígado graso. El aumento de esta relación estimula la expresión de genes marcadores del adipocito, aumento de TG y liberación de ácidos grasos libres en el medio que favorecen la esteatosis y el estrés oxidativo.

Por otro lado, el monitoreo de la relación NADH/NAD⁺ permite conocer el estado redox celular en pacientes bajo estas patologías ya que el equilibrio entre la forma oxidada y reducida refleja la actividad metabólica del cuerpo debido a que estas coenzimas controlan la actividad enzimática. Para este caso, el diagnóstico de su aumento o disminución ayudará a determinar el tratamiento más eficiente para preservar la salud de las células y el bienestar del paciente.

4.6 Parámetros estadísticos

Se calculó el coeficiente de variación del tiempo de migración (Tabla 5), para los cuatro estándares de los nucleótidos de piridina, se observa que el C.V. es menor al 1.5% , demostrando baja dispersión de los datos, lo que indica que a las condiciones establecidas, los analitos en estudio tienden a tener el mismo comportamiento y por lo tanto reproducibilidad y confiabilidad en el análisis.

Tabla 3. Cálculo del coeficiente de variación en los tiempos de migración de los analitos.

	NAD ⁺	NADH	NADP ⁺	NADPH
PROMEDIO	8.228	8.427	10.316	10.564
D. E-	0.074	0.080	0.129	0.133
C. V.	0.904	0.947	1.247	1.255

5 CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología analítica por electroforesis capilar que permite monitorear las relaciones redox NADH/NAD^+ y NADPH/NADP^+ en tejido hepático durante el establecimiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, brindando así una nueva posibilidad para el diagnóstico temprano de dicho trastorno y otras enfermedades que se desencadenan a partir de ella.

Se establecieron las condiciones óptimas de separación por electroforesis capilar y el tratamiento adecuado de la muestra, que incluyó la precipitación de proteínas y las condiciones adecuadas para la reacción enzimática de NAD^+ y NADP^+ , que aseguran la preservación de las coenzimas oxidadas ya mencionadas y con ello el óptimo monitoreo de las mismas y de sus formas reducidas.

Los resultados preliminares en muestras reales comprueban una relación alta tanto de NADPH/NADP^+ y NADH/NAD^+ en los animales con hígado graso, y demuestran la aplicabilidad del método desarrollado.

6 PERSPECTIVAS

El trabajo realizado permite obtener una noción sobre la relación que existe entre NADH/NAD^+ y NADPH/NADP^+ cuando se induce hígado graso.

No obstante, a pesar de que el monitoreo de las coenzimas a través de la altura de la señal obtenida tiende a ser reproducible, es necesaria la validación del método para brindar datos más certeros y confiables.

Otro punto importante a desarrollar es la cuantificación de las coenzimas en tejido de hígado graso, ya que al conocer la concentración se tendrá una mejor información sobre los efectos que produce dicha enfermedad.

7 REFERENCIAS

- 1 <http://image.slidesharecdn.com/tema12-140330103628-phpapp01/95/tema-12-introduccion-metabolismo-22-638.jpg?cb=1424090857>
- 2 https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/77/NADNADH_spanish.svg/250px-NADNADH_spanish.svg.png (Julio 27, 2015)
- 3 Bieganowski P., H. F.. Seidle, M. Wojcik, C. Brenner. 2006. Synthetic lethal and biochemical analyses of NAD and NADH kinases in *Saccharomyces cerevisiae* establish separation of cellular functions. *J Biol Chem*, 281, 22439-22445.
- 4 Magni G., Orsomando G., Raffelli N, Ruggieri S. 2008. Enzymology of mammalian NAD metabolism in health and disease. *Front Biosci*. 1;13:6135-54.
- 5 John R. Ussher, Jagdip S. Jaswal, Gary D. Lopaschuk. 2012. Pyridine Nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. 111: 628-641.
- 6 Michinari Nakamura, Aruni Bhatnagar and Junichi Sadoshima. 2013. Overview of pyridine nucleotides review series. 111.604-610.
- 7 Line Agledal, Marc Niere, Mathias Ziegler. 2010. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP.
- 8 Shi F., Li YF., Wang XY. 2009. Molecular properties, functions, and potencial applications of NAD kinases. *Acta Biochim Biophys Sin*. 41: 352-361.
- 9 Bieganowski P. Seidle HF, Wojcik M, Brenner C. 2006. Synthetic lethal and biochemical analyses of NAD and NADH kinases in *Saccharomyces cerevisiae* establish separation of cellular functions. *J Biol Chem*. 259: 184-189.

- 10 Sen CK. 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potencial of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol.* 52: 149-174.
- 11 Park J, Chung JJ, Kim JB. 2007. New evaluations of redox regulating system in adipose tissue of obesity. *Diabetes Res Clin Pract* 77 (Suppl 1):S11-S16.
- 12 Dessi S, Chiodino C, Batetta B, Fadda AM, Anchisi C, Pani P. 1986. Hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase, cholesterologenesis, and serum lipoproteins in liver regeneration after partial hepatectomy. *Exp Mol Pathol* 44:169-176.
- 13 Dessi S, Batetta B, Spano O, Pulisci D, Mulas MF, Muntoni S. 1992. Serum lipoprotein pattern as modified in G6PD-deficient children during hemolytic anaemia induced by fava bean ingestion. *Int J Exp Pathol* 73:157-160.
- 14 9. Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. 2005. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2(6):273-280.
- 15 Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, Arena A. 2007. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 22(3):293-303.
- 16 Brunt EM. 2004. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 24(1):3-20.
- 17 Skoog, 1994.
- 18 Rivera, 1996.
- 19 Harvey, 2000; Landers, 1996.
- 20 http://www.ce.vt.edu/program_areas/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.html (Marzo 14, 2001).
- 21 <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografía/croma1/html> (Marzo 12, 2001).
- 22 Heiger, 1997
-
-

23 <http://www.ceandec.com> (Marzo 12, 2001).

24 Castillo R., Revilla V. 2005.

25 <http://www.uv.es/baeza/index.html> (Septiembre 2015)

26 "The United States Pharmacopeia", USP 30. Rockville Maryland: United States Pharmacopeial Convection, 2007.

27 Devlin M. Thomas, 2004.

28 Alivisatos, S. G. A., Ungar, F., and Abraham, G. (1964) *Nature* 203, 973-974.

29 Kuhn, R., 1993.

30 Bradford MM- 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.