



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE HPLC PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE PSEUDOURIDINA Y CREATININA EN ORINA

Cte D^a M^a Angeles Cabanes Mariscal, Dra.D^a Pilar Montenegro Álvarez de Tejera, Cap. D^a Paloma Sánchez López, Cap.D. Pedro Álvarez Herranz, Cap. D^a Pilar Prats Oliván, Tcol D. Gustavo Chamorro Merino

OBJETIVOS / Objectives

El ánimo del estudio es evaluar la utilización de la pseudouridina como marcador endógeno en el diagnóstico precoz, progresión y monitorización de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Hemos desarrollado un método rápido, simple, sensitivo y directo para la determinación simultánea de pseudouridina y creatinina en orina, mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de par iónico, en fase reversa. Nuestro Servicio, participa en el proyecto de investigación: "Estudio del catabolismo muscular en la EPOC", que se desarrolla en nuestro Hospital siendo uno de nuestros cometidos, la puesta a punto de dicha técnica.

Actualmente, no existe un marcador idóneo para el diagnóstico temprano y monitorización de EPOC. La prevalencia de la EPOC se sitúa en el 10% de la población y se prevé que siga aumentando. La afectación muscular puede aparecer en sus periodos iniciales de forma silente, sin afectaciones funcionales o antropométricas evidenciables con los test evaluadores admitidos como usuales, como el test de la marcha y el índice de masa corporal. En los pacientes con EPOC, existe pérdida de masa libre de grasa, alteración en la composición muscular, inflamación sistémica y un progresivo agravamiento de la enfermedad pulmonar, por lo que los marcadores urinarios del catabolismo celular de proteínas, como la pseudouridina (PSU), están elevados.

MÉTODOS / Methods

Las muestras de orina se diluyen 10-40 veces con fase móvil, se filtran y se cargan directamente en la columna. La separación y cuantificación se consigue usando una columna C18. La fase móvil está constituida por un tampón fosfato 0.01 M (pH=6.1) conteniendo 2.5 mmol de ácido octanosulfónico como agente de par iónico. Detección UV a 250 nm. Flujo 1ml/min. Temperatura 20°C.

La validación del método se realiza calculando la linealidad, especificidad, exactitud, y precisión de acuerdo a las recomendaciones de la ICH Q2B. Como valor añadido la dilución de la muestra y su estabilidad también se han validado.

La precisión y exactitud del método, incluida la dilución, ha sido determinada en 6 análisis repetidos utilizando la misma muestra de un pool de orina de voluntarios sanos analizados con el método descrito.

Análisis estadístico. El análisis de los datos obtenidos se realiza con el paquete estadístico SPSS (SPSS, Chicago IL), versión 12.0. Una $p < 0.05$ se consideró significativa.

RESULTADOS/Results

La identificación de pseudouridina y creatinina en orina se lleva a cabo comparando el tiempo de retención y la absorbancia ($\lambda = 250\text{nm}$) con los de pseudouridina y creatinina en solución. La cantidad de pseudouridina urinaria se expresa como nmol/ μmol de creatinina. Bajo las condiciones descritas los tiempos de retención fueron 4.8 minutos para pseudouridina y 10.56 min para creatinina.(Figura 1).

Las curvas de calibración fueron lineales en los rangos de 0.23-22.5 y 11.45-1100 nm/mL ($r^2=0.999$, $r^2=0.998$) respectivamente.

LOQ<0.23 y 11.45 nm/mL.(Figura 2).

La repetibilidad del método es satisfactoria con CV 0.67-3%, al igual que la precisión intermedia con CV 3.4-7.20%. En cuanto a la exactitud las recuperaciones fueron superiores a 85.20%(Tablas 1 y 2)

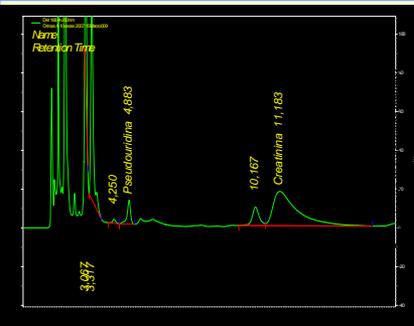


Figura 1: Cromatograma orina paciente. Picos Pseudouridina y Creatinina

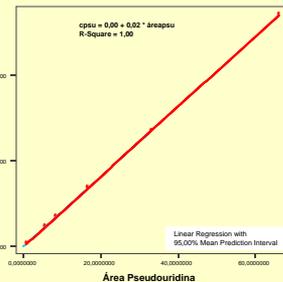


Figura 2: Recta de calibración de la Pseudouridina

Tabla 1: Precisión y Exactitud del Método. Diluciones de Pseudouridina y Creatinina

	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Exactitud	
	Media (DE)	CV %	Media (DE)	CV %	Media (DE) %	CV %
PSU						
Dilución 10	0.392 (0.002)	0.98	0.386 (0.02)	5.18	97.95 (5.19)	5.2
95 %	0.385-0.401		0.364-0.407			
Dilución 20	0.195 (0.006)	3.00	0.18 (0.009)	5.17	94.16 (4.8)	5.0
95 %	0.185-0.204		0.178-0.192			
Dilución 40	0.089 (0.002)	2.2	0.087(0.004)	4.73	87.39 (5.0)	5.8
95 %	0.086-0.092		0.084-0.090			
CREA						
Dilución 10	2.55 (0.049)	1.92	2.38 (0.17)	7.20	93.50 (6.7)	7.16
95 %	2.472-2.628		2.25-2.46			
Dilución 20	1.184 (0.008)	0.67	1.14 (0.039)	3.39	90.69 (3.08)	3.4
95 %	1.170-1.197		0.517-0.557			
Dilución 40	0.562 (0.013)	2.39	0.537 (0.17)	5.86	85.20 (4.9)	5.7
95 %	0.540-0.583		1.119-1.169			

Cada valor representa la media (DE) de 6 cromatogramas distintos de una muestra de orina de 4 personas.

Tabla 2: Precisión y Exactitud Pseudouridina y Creatinina

	Pseudouridina (nmol/ml)		Creatinina (nmol/ml)	
	Añadido nada	Recuperado (%)	Añadido nada	Recuperado (%)
100	197 (10.36) CV = 5.25 176.3-217.7	94.73 (4.82)	550 1262(90.90) CV = 7.2 1080.2-1443.8	96.18(5.53) CV = 5.74 85.12-107.24
325	281.35(14.56) CV = 5.17 252.2-310.5	85.09-104.37	1900 3145.24(184.5) CV = 5.8 3108.3-3182.1	99.47 (7.19) CV = 7.2 85.09-113.85

Cada valor representa la media (DE) de 6 cromatogramas distintos de una muestra de orina de 4 personas.

CONCLUSIONES/ Conclusions

El método ha demostrado ser simple, exacto, preciso y es el utilizado en nuestro laboratorio para la determinación del índice pseudouridina/creatinina.

La detección precoz de posibles cambios en la excreción de pseudouridina, nos ayudaría a detectar de forma fácil y con reducido coste, la aparición de disfunción metabólica muscular en consulta. También sería de utilidad para evaluar la eficacia del tratamiento, diagnóstico y prevención.

REFERENCIAS / References:

- 1- Bolton CE, Ionescu AA, Shiels KM, et al. Associated loss of fat free mass and bone mineral density in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170: 1286-93.
- 2- Li Y, Wang S, Zhong Z. Simultaneous determination of pseudouridine and creatinine in urine of normal children and patients with leukaemia by high performance liquid chromatography. Biomed Chromatogr 1992; 6:191-193.
- 3- Engelen MPKJ, Deutz NEP, Mastert R, et al. Response of whole-body protein and urea turnover to exercise differs between patients with chronic obstructive pulmonary disease with and without emphysema. Am J Clin Nutr 2003; 77: 868-74.
- 4- Ionescu AA, Nixon LS, Luzzio S, Lewis-Jenkins V, Evans WD, Stone MD, Owens DR, Routledge PA, Shale DJ. Pulmonary function, body composition, and protein catabolism in adults with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 495-500.
- 5- ICH. International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use. Validation of analytical procedures: methodology. 6 Noviembre 1996.