Excreción de derivados púricos en leche de oveja.

Martín Orúe, S.M., Dapoza, C., Pérez, J. F., Balcells, J.
Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177.
50013 Zaragoza.

Introducción:

Recientemente ha cobrado un notable interés la estimación de la síntesis de proteína microbiana a partir de la excreción urinaria de derivados púricos (DP). El principio en el que se basa dicho método es simple, las bases púricas que alcanzan el duodeno son activamente absorbidas, metabolizadas sólo parcialmente a xantina (X), hipoxantina (HX), ácido úrico (AU) y alantoína, y como tales excretadas en orina. Si asumimos que los ácidos nucléicos (AN) de la dieta son mayoritariamente degradados en el rumen y que los AN constituyen una fracción constante del N microbiano, el flujo de N microbiano en duodeno puede ser estimado a partir de la relación entre la absorción de bases púricas y la excreción urinaria de sus derivados metabólicos. (Balcells y col., 1991).

La importancia de este método reside en la posibilidad de ser utilizado en animales no alterados quirúrgicamente por lo que puede constituir una herramienta de notable interés en estudios realizados en fases de producción como la gestación y lactación en las cuales es practicamente inviable el uso de animales canulados. Sin embargo, en el caso concreto de la lactación, la utilización de la excreción urinaria de DP como índice de la síntesis microbiana en el rumen podría estar limitada por la presencia de estos compuestos en leche constituyendo una vía de excreción de DP alternativa a la urinaria.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y concentración de metabolitos de excreción de las bases púricas en leche así como su relación con la producción de leche y la excreción urinaria y total de derivados púricos.

Material y Métodos:

Muestras de orina y leche: Las muestras fueron obtenidas a partir de 20 ovejas de raza Rasa Aragonesa con un peso medio de 50 ± 1,4 Kg y una producción media diaria de 1079 gr de leche, con un rango de variación entre 777 y 1537 gr. Los animales recibieron como ración base, paja de cebada tratada con amoníaco suplementada (65:35) con un concentrado elaborado en base a cebada y harina de pescado. Las raciones fueron administradas para conseguir niveles de alimentación de 1,8 veces mantenimiento.

La producción diaria de leche fue estimada por doble ordeño (4 h. de intervalo) previa inyección de oxitocina. La orina fue recojida durante 24 h mediante la utilización de catéteres uretrales conectados mediante un tubo flexible a un contenedor donde fueron conservadas a pH < 3 con una solución de sulfúrico al 10%. Las muestras de leche y orina fueron congeladas a - 20 ºC hasta su análisis.

Análisis: Las muestras (20 de orina y 20 de leche) fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución. En el caso de la orina las muestras fueron analizadas directamente tras una dilución (1/40) y

filtrado (0,22 μm Millipore). Las muestras de leche fueron previamente desnatadas y desproteinizadas, para ello fueron tratadas con dodecil sulfato de sodio (0,1 % manteniendo la muestra en agitación durante 15 minutos) y posteriormente con cloroformo (1:1) homogeneizadas vigorosamente durante 15 minutos. La emulsión resultante fue separada en 3 fases por centrifugación (30000 x g, 30 minutos), muestreando cuidadosamente la fase acuosa superior. Para corregir posibles pérdidas de DP durante el procesado, se añadió alopurinol como estandar interno al descongelar la leche.

Los DP en orina fueron determinados siguiendo la técnica propuesta por Balcells y col, (1992). En leche, la presencia de compuestos polares de bajo peso molecular, de características cromatográficas muy similares a la alantoína, impidieron una correcta definición de este compuesto, por ello la técnica fue modificada manteniendo las condiciones de fase reversa descritas en la técnica original pero utilizando una substancia con propiedades par-iónicas (ácido heptanosulfónico, AHS, Tampón A: 10 mM sulfato amónico, 5 mM AHS; Tampón B: igual que el A con un 20% de acetonitrilo; pH 6) Esta substancia modificó el tiempo de retención de los compuestos de interferencia y proporcionó una resolución satisfactoria de la alantoína.

Tabla 1. Concentraciones medias (μM) de derivados púricos, creatinina y pseudouridina en orina y leche de ovejas lactantes.

	Orina		Leche	
	Media	E.S.	Media	E.S
Alantoína	7829,0	665,29	158,1	7,81
Acido úrico	386,8	24,14	87,6	11,12
Xantina	48,1	4,62	ND	
Hipoxantina	630,1	77,36	ND	
Creatinina	5080,1	380,74	84,1	5,93
Pseudouridina	171,4	14,70	ND	

ND no detectada

Resultados y Discusión.

En la tabla 1 se presentan las concentraciones medias de derivados púricos, pseudouridina y creatinina en orina y leche.

Como puede apreciarse xantina e hipoxantina no pudieron ser detectadas en las muestras de leche. La alantoína en ambos fluidos biológicos fue el DP predominante aunque la proporción de ácido úrico en leche fue mayor que en orina. Así la excreción de alantoína en leche representó el 1,6 ± 0,10 % del total de alantoína excretada mientras que el 15,3 ± 1,96 % del AU fue excretado vía glándula mamaria. El elevado contenido en AU y las bajas concentraciones de X e HX pueden ser explicadas por la transformación de la X e HX a ácido úrico en la glándula mamaria o en la propia leche, lo que se deduce de las elevadas concentraciones de xantín oxidasa descritas por diversos autores en leche (Ortín y col., 1991). Sin embargo

la proporción del AU láctico respecto al total de DP excretados por leche excede a la proporción de los DP no alantoínicos en orina, de lo que se deduce que el AU sería el producto de excreción preferente del metabolismo purínico en la glándula mamaria. La ausencia de uricasa en la glándula confirmaría esta posibilidad y el orígen plasmático de la alantoína excretada en leche.

Tabla 2 : Relación entre la excreción de alantoína y derivados púricos en leche (μmol/d) en función de (1) su producción (g/d) y (2) la excreción total de DP (μmol/d).

y	a x + b	r	p
(1) Excreción de alantoína	0,227 x - 81,338	0,744	0,0002
(1) Excreción de DP	0,382 x - 155,503	0,721	0,0003
(2) Excreción de alantoína	0,009 x + 62,995	0,548	0,012
(2) Excreción de DP	0,015 x + 84,665	0,537	0,014

Los mecanismos por los cuales la alantoína es excretada por glándula mamaria no han sido descritos, aunque la existencia de mecanismos de difusión pasiva similares a los descritos en glándulas salivales (Surra, 1994) justificarían la estrecha correlación entre la excreción de DP en leche y la producción de leche o la excreción total de DP; en el primer caso por un mayor drenaje de plasma y en el segundo por una mayor concentración de DP en el mismo. (Tabla 2).

En efecto, la glándula mamaria participaría con el riñón en la eliminación de alantoína y ésta sería excretada en relación a la concentración plasmática en proporciones constantes aunque no equivalentes por lo que, en principio, no se descartaría la excreción láctea como un índice de la síntesis microbiana en el rumen. No obstante los niveles de excreción de alantoína o DP en leche, así como su variabilidad, confirman la necesidad de estimar dicho parámetro a partir de colecciones totales o en su defecto por muestras puntuales de orina.

Bibliografía.

Balcells, J.; Guada, J. A.; Castrillo, C. y Gasa J. (1991). Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, **116**, 309-317.

Balcells, J.; Guada, J. A.; Peiró, J. M. y Parker, D. S. (1992). Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-perfomance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **575**, 153-157.

Ortín, A.; López-Pérez, M. J.; Muiño Blanco, M. T. y Cebrian Perez, J. A. (1991). Extraction of xanthine oxidase from milk by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography*, **558**, 357-367.

Surra, J. C. E. (1994). Excreción de los derivados del metabolismo de las bases púricas en la especie ovina. *Tesis doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.