

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

ESTUDIO PRELIMINAR DE POSIBLES BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE
PRÓSTATA EN ORINA

Trabajo Especial de Grado presentado ante La
Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la
Br. Flor Celeste Romero Segura, para optar al
título de Licenciado en Química.

Caracas, octubre de 2014

ACTA

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: “**ESTUDIO PRELIMINAR DE POSIBLES BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN ORINA**”. Presentado por la Br. Flor Celeste Romero Segura, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dra. Nereida Carrión
(Directora)

Dr. José Chirinos
(Jurado)

Dr. Gustavo Pérez
(Jurado)

Yo profesora Nereida Carrión, investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela. Certifico que, el Trabajo Especial de Grado, titulado:

“ESTUDIO PRELIMINAR DE POSIBLES BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN ORINA”

Que presenta la Br. Flor Celeste Romero Segura, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2013-2014, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, octubre de 2014

Dra. Nereida Carrión

AGRADECIMIENTOS

Mis agradamientos van dirigidos primeramente a **DIOS todo poderoso**, por la paciencia otorgada durante la investigación y las bendiciones recibidas durante ella.

A mis padres **Luisa Dolores** y **William José** por toda su ayuda y apoyo incondicional, emocional y económico jajaja. **ESTO SE LO DEDICO A ELLOS.**

A mi querida tutora la **Dr. Nereida Carrión** por su apoyo y ayuda académica, y por darme ese voto de confianza al convertirme en su tesista (orgullosa yo de serlo). Toda mi admiración hacia ella y su trabajo de investigación.

Mi gratitud a todo el Servicio de Química Analítica (**CQA**) por la ayuda prestada durante mi investigación. A **Manuel** por todos los favores realizados y su apoyo como amigo
MIL GRACIAS!! Al **prof. Gustavo** gracias por sus sabios consejos.

A **Fátima** por su gran ayuda y apoyo durante los análisis realizados en el IVIC.

A mi herma **Corina**, por todas sus palabras de aliento y ánimo en momentos más necesitados, y a mi amor **Victor** le doy las gracias por su amor, apoyo y lealtad.

A mis amigas **Dani**, **Lulu** y **Nore** gracias a ustedes las cosas en la universidad y la tesis se hicieron más llevaderas y divertidas jajaja. Las quiero!!

A mi abuelita **Florinda** por todas las comidas que me hizo y por recibirme en su casa durante mis estudios en la casa que vence las sombras.

Y a mi gente de Cumaná a todos!!

RESUMEN

El cáncer de próstata representa actualmente un grave problema de salud, siendo una de las primeras causas de muerte en hombres en el mundo occidental, y en particular en nuestro país Venezuela es la primera causa de muerte por cáncer en estadística en hombres. Una manera de reducir estas cifras, es mediante un diagnóstico precoz, se busca que la forma de diagnóstico sea poco invasiva y con una alta especificidad. Por tal razón, en los últimos años se han realizado investigaciones en la búsqueda de marcadores tumorales en la orina, especialmente metabolitos marcadores de células malignas. En este sentido, se planteó como objetivo de investigación el estudio de los aminoácidos Ácido aspártico, Serina, Arginina, Leucina e Isoleucina en muestras de orina de sujetos sanos, pacientes con hiperplasia y pacientes con cáncer de próstata. Las muestras fueron donadas por los pacientes del servicio de Urología del Hospital Universitario de Caracas (HUC).

Se analizaron veinticuatro (24) muestras de orina: diez (10) sujetos sanos, ocho (8) pacientes con cáncer de próstata, seis (6) pacientes con hiperplasia. Para la determinación de los aminoácidos en la orina, se utilizó la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) con detección por fluorescencia y derivatización pre-columna con o-ftaldialdehído/2-mercatoetanol (OPA/2-ME).

El método resultó sensible con límites de detección de 0,02; 3; 30; 0,4 y 0,09 $\mu\text{mol/L}$ para los aminoácidos Ácido aspártico, Serina, Arginina, Isoleucina y Leucina respectivamente. El porcentaje de recuperación obtenido para todos los aminoácidos estuvo entre 80-90%, rango que se considera aceptable para muestras biológicas.

De los aminoácidos estudiados: el ácido aspártico, serina, arginina, isoleucina no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de individuos estudiados: sujetos sanos, pacientes con hiperplasia y pacientes con cáncer.

La leucina presentó diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con cáncer, los sujetos sanos y pacientes con hiperplasia. Los rangos de concentración excretados fueron de 0,8-2,2 $\mu\text{mol/L}$ para el grupo de cáncer, 24-120 $\mu\text{mol/L}$ para el grupo sano y 13-108 $\mu\text{mol/L}$ para el grupo de hiperplasia. Es posible que la diferencia encontrada para los pacientes con cáncer con respecto a los grupos de sujetos sanos y pacientes con hiperplasia se relacione con la presencia de células malignas en la próstata, sin embargo se requiere de estudiar un mayor número de muestras para dilucidarlo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre los resultados para los aminoácidos normalizados con la creatinina y sin normalizar.

INDICE

Pág.

I. INTRODUCCIÓN

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Cáncer

II.1.1. Definición.....1

II.1.2. Tipos de cáncer.....3

II.1.3. Frecuencia del cáncer en Venezuela.....4

II.2. Cáncer de próstata.....5

II.2.1. Incidencia y mortalidad en el mundo.....9

II.2.2. Incidencia y mortalidad en Venezuela.....10

II.2.3. Factores de riesgo.....11

II.2.4. Métodos de diagnóstico.....12

II.3. La próstata

II.3.1. Definición.....15

II.3.2. Zonas específicas de la próstata.....17

II.4. Biomarcadores

II.4.1. Definición.....18

II.4.2. Clasificación de los biomarcadores.....19

II.4.3. Marcadores tumorales actuales.....20

II.5. Aminoácidos.....20

II.5.1. Técnicas para el análisis de aminoácidos.....22

II.6. Derivatización.....22

II.6.1. Sensibilidad.....23

II.6.2. Detección UV-Visible y fluorescencia.....24

II.6.3. Derivatización post-columna.....25

II.6.4. Derivatización pre-columna.....25

II.6.5. Derivatización de aminoácidos.....26

II.7. creatinina.....	28
II.7.1 Método analítico para la determinación de creatinina.....	29
II.8. Método cromatográfico.....	30
II.8.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	31
II.8.1.1. Ventajas y desventajas.....	32
II.8.1.2. Modos de separación en HPLC.....	34
II.8.1.3 Instrumentación para cromatografía líquida (HPLC).....	29
III. ANTECEDENTES.....	40
IV. OBJETIVOS	
IV.1. General.....	47
IV.2. Específicos.....	47
V. PARTE EXPERIMENTAL	
V.1. Instrumentación.....	48
V.2. Reactivos.....	48
V.2.1. Fase Móvil.....	49
V.2.2. Soluciones Patrón.....	49
V.2.3. Derivatizante.....	50
V.2.4. Muestras.....	50
V.3. Proceso de derivatización.....	51
V.4. Condiciones cromatográficas para la separación de los aminoácidos.....	51
V.5. Identificación de los aminoácidos.....	53
V.6. Determinación de la concentración de los aminoácidos.....	54
V.7. Tratamiento de la muestra.....	57
V.8. Determinación analítica de la creatinina	
V.8.1. Tratamiento de la muestra.....	57
V.8.2. Cuantificación de la creatinina en las muestras de orina y preparación de la curva de calibración.....	58
V.9. Tratamiento estadístico.....	59

V.10. Procedimiento para la determinación del porcentaje de recuperación.....	60
---	----

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	86
RECOMENDACIONES.....	87
GLOSARIO.....	88
BIBLIOGRAFÍA.....	90
APÉNDICE.....	98

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.Principales causas de mortalidad en Venezuela. Ambos géneros. 2010.....	6
Tabla 2.Frecuencia del cáncer en Venezuela. Estadística de cáncer en hombres 2010.....	11
Tabla 3. Soluciones patrón de aminoácidos.....	49
Tabla 4. Programa de elución para la separación de los aminoácidos.....	52
Tabla 5. Programa de elución utilizado en la separación de los aminoácidos en la orina.....	53
Tabla 6. Patrones para la determinación de creatinina.....	58
Tabla 7. Condiciones cromatográficas para la separación de los aminoácidos.....	62
Tabla 8. Identificación de los aminoácidos.....	63
Tabla 9. Limite de detección y limite de cuantificación.....	64
Tabla 10. Comparación de los limites de detección.....	64
Tabla 11. Porcentaje de recuperación de las muestras para los aminoácidos.....	66
Tabla 12. % RSD de los tiempos de retención, áreas y concentración.....	66
Tabla 13. Intervalos de concentración ($\mu\text{mol/L}$) de los estándares de los aminoácidos, pendiente, intercepto, coeficiente de correlación y error estándar de la pendiente y del intercepto, para la determinación aminoácidos en orina.....	68
Tabla 14. Concentración de los aminoácidos en la orina de los sujetos sanos.....	69

Tabla 15. Concentración de los aminoácidos en la orina de los pacientes con hiperplasia.....	72
Tabla 16. Concentración de los aminoácidos en la orina de los pacientes con cáncer de próstata.....	74
Tabla 17. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para la serina.....	79
Tabla 18. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para la leucina.....	81
Tabla 19. Verificación de las varianzas de los tres grupos para la leucina.....	82
Tabla 20. Rango de valores de la isoleucina en los tres grupos.....	83
Tabla 21. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para la isoleucina.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Célula normal (superior) célula cancerosa (inferior).....	2
Figura 2. Tipos de tumores. Benigno y Maligno.....	3
Figura 3. Diferencia entre próstata normal y afectada por recrecimiento.	6
Figura 4. Incidencia promedio del quinquenio 2001-2005. Cáncer de próstata, por entidades federales de Venezuela.....	10
Figura 5. Esquema de la próstata y ubicación.....	16
Figura 6. Esquema de las zonas de la próstata.....	17
Figura 7. Estructura química de un α -aminoácido.....	21
Figura 8. Reacción de derivatización entre el OPA/2-ME y un α -aminoácido.....	27
Figura 9. Estructura química de la creatinina.....	29
Figura 10. Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.....	34
Figura 11. Curva de calibración del ácido aspártico.	54
Figura 12. Curva de calibración de la serina.....	55
Figura 13. Curva de calibración de la arginina.....	56
Figura 14. Curva de calibración de la leucina.....	58
Figura 15. Curva de calibración de la isoleucina.....	58
Figura 16. Curva de calibración de la creatinina.....	59
Figura 17. Cromatograma de los patrones de los aminoácidos.....	61

Figura 18 (A) cromatograma de muestra sin enriquecer. (B) cromatograma de muestra enriquecida.....	63
Figura 19. Representación gráfica de los valores de concentración de ácido aspártico en las muestras de orina de los tres grupos.....	77
Figura 20. Representación gráfica de los valores de concentración de serina en las muestras de orina de los tres grupos.....	78
Figura 21. Representación gráfica de los valores de concentración de serina normalizada en las muestras de orina de los tres grupo.....	79
Figura 22. Representación gráfica de los valores de concentración de leucina en las muestras de orina de los tres grupos.....	80
Figura 23. Representación gráfica de los valores de concentración de leucina normalizada en las muestras de orina de los tres grupos.....	81
Figura 24. Representación gráfica de los valores de concentración de isoleucina en las muestras de orina de los tres grupos.....	84
Figura 25. Representación gráfica de los valores de concentración isoleucina normalizada en las muestras de orina de los tres grupos.....	85

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata constituye un serio problema de salud en el mundo occidental, estimándose que uno de cada seis hombres desarrollará la enfermedad en el transcurso de su vida. En Venezuela, corresponde a la primera causa de muerte en hombres (estadística en cáncer) con una tasa de mortalidad que ha ido aumentando durante los últimos años. No obstante estas cifras epidemiológicas, hacen gran énfasis en el despistaje precoz, ya que la evidencia indica que los pacientes gozan de una larga sobrevida cuando se realiza el diagnóstico en forma oportuna. Las herramientas con que se dispone actualmente para detectar precozmente la enfermedad son el tacto rectal y el antígeno prostático específico. Con respecto a éste último, debido a su baja especificidad, se ha producido un incremento en el número de biopsias prostáticas realizadas innecesariamente, la biopsia prostática es un procedimiento poco agradable e invasivo, razón por la que causa la deserción de muchos pacientes a la hora de realizarse este procedimiento.

Hoy en día existe suficiente evidencia que la detección precoz de cáncer de próstata disminuye la mortalidad, El desafío de esta enfermedad se centra en encontrar nuevos marcadores que permitan identificar aquellos hombres que se encuentren en mayor riesgo, evitando así procedimientos innecesarios como biopsias. Por la elevada incidencia e importante mortalidad del cáncer de próstata, su prevención primaria constituye uno de los principales retos para la salud. Actualmente existe una gran tendencia en investigaciones realizadas en la orina de hombres con cáncer de próstata. Por tal motivo, esta investigación está dirigida a la búsqueda de biomarcadores en la orina, para la detección temprana y predicción del cáncer de

próstata. La orina es fácilmente disponible, y potencialmente puede ser una prometedora fuente de biomarcadores.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. EL CÁNCER

II.1.1. DEFINICIÓN

La palabra cáncer se utiliza para denominar un grupo de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas con rasgos típicos de comportamiento y crecimiento descontrolado (ver figura 1). Las células cancerosas “olvidan” la capacidad de morir y se dividen casi sin límites, estas células llegan a formar unas masas, que en su expansión destruyen y sustituyen a los tejidos normales, dando lugar a tumores sólidos o enfermedades hematológicas y/o linfáticas en función de los tejidos afectados ^[1]. En el siglo dieciocho el cáncer comenzó a ser estudiado sistemática e intensamente. Bichat (1771-1802) describió la patología de muchas neoplasias en humanos y propuso que el cáncer era una “formación accidental” de tejido, formada del mismo modo que cualquier otra porción del organismo. Una década más tarde, Müller (1801-1858) demostró que el tejido canceroso estaba formado por células ^[2].



Figura 1. Célula normal (superior). Célula cancerosa (inferior). ^[3]

Existen dos tipos de tumores, denominados tumores benignos y tumores malignos. Los primero crecen a un ritmo lento, no se diseminan, ni infiltran los tejidos vecinos; mientras que los segundos invaden y dañan tejidos y órganos cercanos al tumor. (Ver figura 2). ^[1]

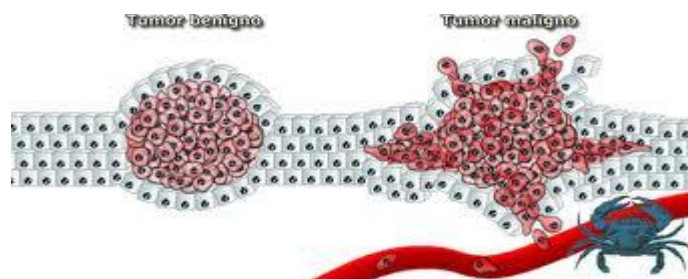


Figura 2. Tipos de tumor. Benigno y Maligno. ^[4]

II.1.2. TIPOS DE CÁNCER

El tipo de cáncer se define, entre otras cosas, por el tejido u órgano en el que se formó, aunque pueden definirse tantos tipos de cáncer como enfermos, cada uno con sus alteraciones moleculares y celulares específicas.

Así, según el tejido de origen, podemos definirlos como:

- Carcinomas: se forman a partir de células epiteliales, estas células tapizan la superficie de órganos, glándulas o estructuras corporales.
- Sarcomas: son cánceres que se forman a partir del tejido conectivo o conjuntivo, del que derivan los músculos, huesos, cartílagos o tejido graso.
- Leucemias: se originan en la médula ósea, tejido encargado de mantener la producción de glóbulos rojos, blancos y plaquetas.
- Linfomas: se desarrollan a partir del tejido linfático, como el existente en ganglios y órganos linfáticos ^[1].

II.1.3. FRECUENCIA DEL CÁNCER EN VENEZUELA

El cáncer constituye en Venezuela una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad, por lo que una de cada cuatro personas si alcanza la edad de 74 años, puede padecer algunas de sus variedades y una de cada siete tiene el riesgo de morir por cáncer. ^[5]

En la tabla 1 se presentan las primeras cinco causas de mortalidad de ambos géneros en el país para el año 2010 de acuerdo a lo publicado en el anuario de mortalidad del Ministerio Popular para la Salud, como puede observarse, el cáncer ocupa el segundo lugar entre las diversas causas de muerte, siendo solo superada por enfermedades del corazón y representando aproximadamente el 15% de la mortalidad diagnosticada en el país. ^[5]

Tabla 1. Principales causas de mortalidad en Venezuela. Ambos géneros. 2010. ^[5]

Causas de muerte	Mortalidad (n° Ind)	Porcentaje (%)
Enfermedades del corazón	24.353	20,99
Cáncer	18.155	15,30
Enfer. Cerebrovasculares	8.695	7,68
Suicidio y homicidio	8.614	7,12
Accidentes de otro tipo	8.471	6,64
Otras causas	49.543	42,05

Por sus características de evolución y desarrollo, este conjunto de enfermedades revisten una gran complejidad, tanto en el orden médico por las implicaciones en tecnología de diagnóstico y tratamiento; como en el psicosocial, por la carga emocional y económica que representa ^[6].

II.2. CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer se produce cuando algunas células prostáticas mutan y comienzan a multiplicarse descontroladamente ^[7]. El cáncer de próstata es el tumor maligno más frecuente del aparato genitourinario del hombre y constituye el segundo cáncer más frecuente en Europa, después del cáncer de pulmón, mientras que en Estados Unidos le ha superado. La hipótesis etiológica más aceptada es la teoría del desequilibrio hormonal ya que no se ha visto nunca este tipo de tumor en hombres castrados ^[8].

El crecimiento maligno de la próstata (ver figura 3) tiene la peculiaridad de permanecer largos períodos de tiempo asintomáticos ya que afecta a las glándulas de la zona periférica posterior, zona alejada de la uretra ^[8].

Existen varias formas o categorías en las que se puede clasificar un carcinoma de próstata; entre las más comunes se encuentran, el carcinoma clínicamente manifiesto, en donde el diagnóstico se establece por exámenes clínicos, obstrucción uretral, hematuria etc. Y el carcinoma latente, el cual es descubierto por autopsias. El carcinoma clínicamente manifiesto parece tener menos frecuencia que el carcinoma latente. ^[8]

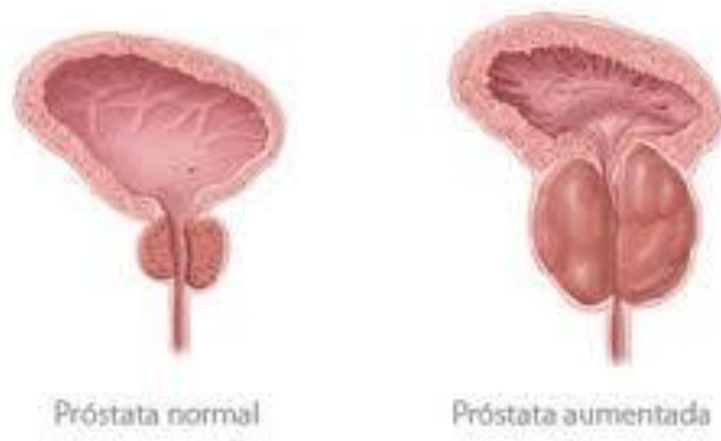


Figura 3. Diferencia entre próstata normal y afectada por recrecimiento. ^[9]

Además del cáncer de próstata, existen otros problemas comunes con referente a la próstata, como lo son: la prostatitis, que es una infección generalmente causada por bacterias y la hiperplasia prostática benigna, que corresponde al aumento del tamaño de la próstata. ^[10]

El término prostatitis se utiliza para definir aquellos procesos de naturaleza inflamatoria o infecciosa que afecta a la glándula prostática. Son procesos benignos y su padecimiento no tiene relación directa con la probabilidad de padecer hiperplasia benigna de próstata o cáncer. La prostatitis es un trastorno de salud muy común en los hombres, y la padecen alrededor de un 25% de los hombres jóvenes y en edad media ^[10].

Hiperplasia prostática benigna (HBP), se caracteriza por un aumento del tamaño de la glándula que ocasiona grados variables de obstrucción en la evacuación de la

vejiga. Es una de las enfermedades que con mayor frecuencia se presentan en hombres adultos de avanzada edad. Constituye la segunda causa de ingreso para intervención quirúrgica y la primera causa de consulta en los servicios de urología. El desarrollo de la HBP comienza alrededor de la cuarta década de la vida con un fenómeno focal de origen estromal. A partir de la quinta década se produce un incremento global y rápido del volumen debido a un aumento de las células del tejido fibromuscular y glandular, tanto en la zona periuretral como transicional ^[10].

II.2.1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD EN EL MUNDO

En el mundo las tasas de incidencia y mortalidad varían de país a país. En el 2002 hubo 679.000 nuevos casos de cáncer de próstata en el mundo, y es el quinto cáncer más frecuente en el mundo y el segundo más frecuente en varones. En USA en 1995 se diagnosticaron 244.000 casos y hubo más de 40.000 muertes. En 2003, se diagnosticaron 220.900 nuevos casos y fallecieron 28.900. Para 2008 se estimó diagnosticar 186.320 nuevos caso. ^[10].

Según la Unión Europea, el riesgo de mortalidad por esta enfermedad ha crecido en 5% entre el año 1985 y 2003. En México, las neoplasias prostáticas malignas ocuparon el segundo lugar en la tabla de mortalidad general. Durante 1995 y hasta 2011 han existido 3766 defunciones y una tasa de 71,1 por 100 mil para hombres con edades de 65 años y más. ^[11]

El Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) advirtió que en la actualidad ya fallecieron más de ocho millones de hombres por causa del cáncer de próstata y que el 70% de esos decesos ocurre en los países en desarrollo. La alta

mortalidad en estas naciones se debe a las carencias de recursos necesarios para prevenir, diagnosticar y tratar el padecimiento y las debilidades en los programas nacionales de lucha contra el cáncer ^[12].

II.2.2. INCIDENCIA Y MORTALIDAD EN VENEZUELA

En la figura 4 se puede observar la tasa de incidencia del cáncer de próstata en hombres venezolanos, vistas desde cada entidad federal; en donde el estado Trujillo ocupa la primera posición con una tasa de 44,9 casos por 100.000 varones, seguido por el estado Monagas con 42,1 y Guárico con 41,9. El promedio nacional es de 31,0 y los estados nacionales con tasas menores son: Portuguesa, Delta Amacuro y Amazonas, con 18,4; 20,2 y 22,1, respectivamente.

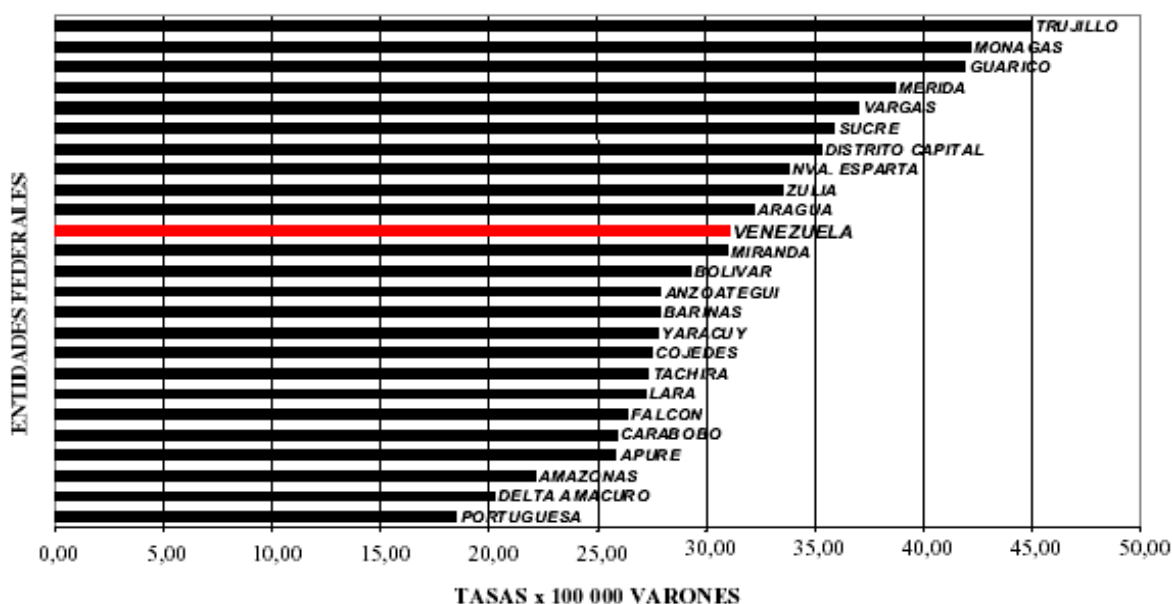


Figura 4. Tasa de incidencia promedio del quinquenio 2001-2005. Cáncer de próstata por entidades federales de Venezuela. ^[6]

El cáncer constituye en Venezuela una de las causas de enfermedad o muerte más frecuentes. Según los datos estadísticos publicados en el Anuario Epidemiológico de 2010 (el más actualizado hasta la fecha) y los datos de morbilidad del Registro Central de Cáncer, del Programa de Oncología del Ministerio del Poder Popular para la Salud, en la población masculina, el cáncer de próstata es el más frecuente con una incidencia estimada en 2250 casos anuales (ver tabla 2) ^[5].

Tabla 2. Frecuencia del cáncer en Venezuela. Estadística de cáncer en hombres. 2010. ^[5]

Cáncer	Frecuencia
Próstata	2250
Tráquea, bronquios y pulmón	2041
Estomago	1164
Laringe	309
Colon, recto y ano	702
Vejiga urinaria	203

II.2.3. FACTORES DE RIESGO

Factores genéticos y familiares

Los factores genéticos del cáncer de próstata se deducen del agrupamiento de casos clínicos en determinadas familias. Un estudio epidemiológico ha demostrado que el riesgo de que un hombre desarrolle cáncer de próstata es aproximadamente 2 veces el de la población general, si tiene un pariente de primer grado afectado por la enfermedad.^[13]

Edad

El cáncer de próstata se ha asociado con la edad avanzada. La prevalencia del cáncer de próstata tanto histológico como clínico aumenta con la edad, más rápidamente que cualquier otro cáncer.

Raza

La prevalencia de cáncer de próstata en hombres negros, blancos y amarillos es marcadamente diferente. Ross y colaboradores demostraron que los jóvenes negros de los Estados Unidos, tenían niveles de testosterona aproximadamente 15% más altos que los jóvenes blancos del mismo país y esta diferencia podría explicar el mayor riesgo de cáncer de próstata.

Hormonas

Evidencias clínicas tanto indirectas como directas sugieren el papel de las hormonas sexuales en el cáncer de próstata. El cáncer de próstata es raro en los hombres privados de andrógeno, por ejemplo: eunucos o prisioneros que han sido castrados por razón de ofensas sexuales. Además, existe evidencia clínica de regresión

tumoral después de la castración quirúrgica o medica, lo cual sugiere una dependencia hormonal para el cáncer de próstata.

Factores dietéticos

Tres componentes dietéticos han sido estudiados en relación con el desarrollo del cáncer de próstata: grasas dietéticas, betacarotenos y vitamina A. Armstrong y Doll encontraron que las muertes por cáncer de próstata en 32 países estaban altamente correlacionadas con el consumo total de grasas.

Infección e inflamación

Se sospecha que los virus del herpes, el papiloma y el citomegalovirus, así como algunas infecciones bacterianas transmitidas por el contacto sexual pueden causar que varones con susceptibilidad genética, desarrollen cáncer de próstata. Existe evidencia que indica que la inflamación ocasionada por estas infecciones es una condición que facilita el desarrollo del cáncer de próstata. La biopsia de próstata causa inflamación. Esta inflamación aumenta proporcionalmente con el número de cortes efectuados, con lo traumático que ellos sean y con el número de biopsias practicadas por lo cual el hecho de efectuar biopsias repetidas podría indirectamente aumentar las posibilidades de desarrollar el cáncer. ^[13]

II.2.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del cáncer de próstata se realiza en diversas circunstancias. En el 10% de los pacientes se detecta en forma accidental durante una extracción transuretral de la próstata debido a una hiperplasia nodular, examen de rutina del nódulo prostático o de una glándula anormalmente indurada ^[13].

Las asociaciones mundiales del cáncer afirman que la detección sistemática (pesquisas) del cáncer de próstata requiere anualmente un tacto rectal y la medición de la concentración sérica del Antígeno Prostático Específico (PSA) en los hombres mayores de 50 años ^[13].

El Antígeno Prostático Específico (PSA) fue descubierto independientemente por dos grupos de las décadas de 1960 y 1970, en el semen y tejido de la próstata, y dado diferentes nombres. Más tarde se hizo evidente que estas proteínas fueron codificadas por el mismo gen y son la misma proteína. PSA se identificó después como un marcador útil para la evaluación de pacientes con cáncer de próstata durante su seguimiento ^[14]. El PSA es el marcador más ampliamente utilizado en suero para el cáncer de próstata. El punto de corte inicial de nivel normal se fijó en 4 ng/mL para la mayoría de los hombres, aunque actualmente se tomó como rango normal de 0 a 2,5 ng/mL, sin embargo, más del 50% de los hombres no presentan cáncer a pesar del valor de PSA por encima del nivel normal ^[15].

Por su parte, el tacto rectal es una maniobra semiológica compleja cuya finalidad es descubrir las alteraciones revelables mediante la inspección de la región perianal y palpación del esfínter, ampolla rectal y su contenido. El tacto rectal dará casi siempre el diagnóstico para una próstata afectada, aunque existe un 10% de pacientes cuyas próstatas son normales al tacto, pero que presentan carcinomas. La “biopsia prostática” por aguja en casos de sospecha, ayudará con el diagnóstico ^[16].

La biopsia prostática es un procedimiento ineludible para el diagnóstico del cáncer de próstata ^[17]. Una biopsia prostática analiza menos del 1% del total de la próstata, lo que puede dar lugar a que no se detecte un cáncer de próstata sustancial, esto puede tranquilizar falsamente al médico y al paciente. Por otra parte, un resultado de la biopsia positivo, puede detectar un cáncer de pequeño volumen y clínicamente no significativo, que no pone en peligro la vida y que puede conducir a un tratamiento innecesario o a un exceso de tratamiento. Entre el 10 y 30% de los cánceres de próstata son estimados preoperativamente como peores de lo que realmente son. Aunque la biopsia ya indica la presencia del cáncer, se precisa más información para determinar su tipo, naturaleza y gravedad. Esto nos lleva a la clasificación por grados de Gleason, que va con una puntuación de 2 a 10. Desde ahora se ha convertido en el estándar internacional a través del cual se describe y se mide el cáncer de próstata. ^[18]

Las técnicas más comúnmente empleadas en el momento actual se apoyan en la ecografía para la localización topográfica de la biopsia, y se suele realizar por vía transrectal. De hecho, un procedimiento como la biopsia prostática presenta un índice no desdeñable de complicaciones. Entre las más comunes destacan la aparición de hematuria, hemospermia, sangrado rectal e incluso fiebre post-biopsia e infecciones. ^[17]

II.3. LA PRÓSTATA

II.3.1. DEFINICIÓN

El término “próstata” viene del griego *prostates*, que significa “uno que está delante” ^[19]. Es un órgano compuesto por glándulas y escromas, ambos íntimamente

unidos y delimitados por la capsula prostática común. Tienen forma de castaña o triángulo achatado en su base o cara superior. Pesa 20 a 25g y mide 3 x 4 x 2,5 cm en el hombre adulto. Está alojada en el compartimiento o nicho prostático inmediatamente por debajo de la vejiga, en relación con la cual se halla su base o cara superior. Su extremo opuesto, más aguzado, el ápex o vértice prostático, termina junto al segmento distal de la uretra prostática en la aponeurosis perineal media. Las glándulas de la próstata están formadas en su mayor parte por células secretoras, de las que derivan las adenocarcinomas, que son los órganos más frecuentes de este órgano ^[20].

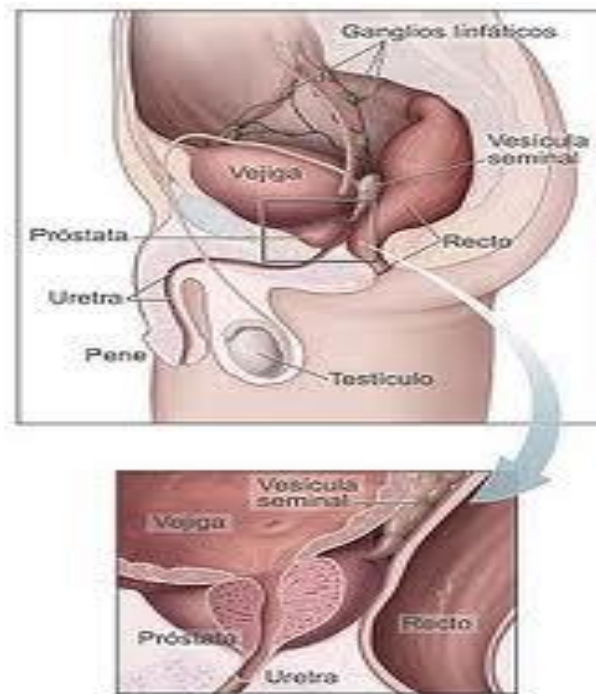


Figura 5. Esquema de la próstata y ubicación. ^[21]

II.3.2. ZONAS ESPECÍFICAS DE LA PRÓSTATA

En la próstata se distinguen tres zonas: a) zona de transición, correspondiente al 10% de la glándula, ubicada en la base y en relación a la uretra y la vejiga; b) zona central, correspondiente al 20% de la glándula, ocupa la base en relación con las vesículas seminales; c) zona periférica, correspondiente al resto de la glándula 70%. La zona central probablemente es de origen wolffiano, mientras que la zona de transición y periférica derivan de evaginaciones de la uretra proximal. Estas últimas dos zonas se consideran el sitio de origen del adenocarcinoma de la próstata. ^[20]

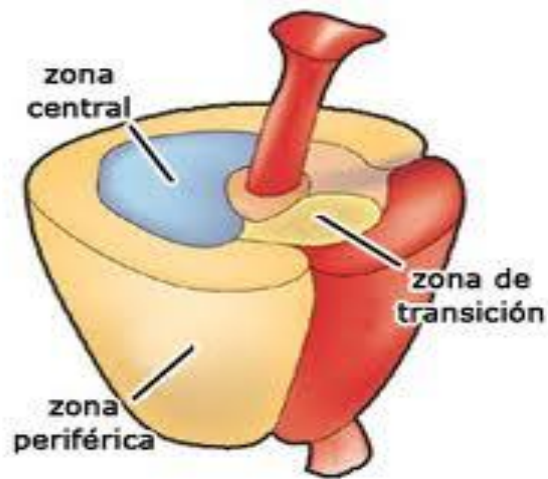


Figura 6. Esquema de las zonas de la próstata. ^[21]

II.4. BIOMARCADORES

II.4.1. DEFINICIÓN

Un biomarcador se podría definir, en sentido amplio, como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructura o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra ^[23]. Por otra parte, Silbergeld y Davis ^[24] hablan de marcadores biológicos para referirse a señales fisiológicas inducidas por un xenobiótico que refleja una exposición, una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para la resolución de estos problemas.

Los marcadores tumorales, conocidos también como biomarcadores, son sustancias producidas por las células tumorales o por células normales del cuerpo, como respuesta a la presencia de un cáncer o también a ciertas afecciones benignas (premalignas) del cáncer. Estas moléculas se pueden encontrar en la sangre, orina, tejidos tumorales o en tejidos sanos cercanos al tumor. Actualmente, se han encontrado más de doce sustancias que parecen expresarse en forma anormal cuando ciertos tipos de cáncer se presentan. El problema radica en que estos mismos biomarcadores de igual manera se pueden expresar en otros padecimientos o inclusive en ciertos estados metabólicos ^[25].

II.4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

En general todos los autores distinguen tres tipos de biomarcadores: de exposición, de susceptibilidad y de respuesta (o de efecto).

Es de particular interés profundizar en los biomarcadores de exposición, los cuales pueden ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina fundamentalmente) ^[23,24]. Con referente a esto, Bernard y lauwers ^[28] dividen los marcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los marcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (p. ej. plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (p.ej. tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrofílicas).

Por su parte los biomarcadores de susceptibilidad, sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben a factores genéticos, reconocidos por estudios de ADN. Mientras que los biomarcadores de respuesta, son indicativos de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobiótico, incluye modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas ^[23].

II.4.3. MARCADORES TUMORALES ACTUALES

Los marcadores tumorales séricos pueden mostrar datos confirmatorios en pacientes con hallazgos indicativos de una neoplasia maligna específica; sin embargo, estos marcadores no son útiles para discriminar los que tienen cáncer. La α -fetoproteína puede estar elevada en el carcinoma hepatocélular y en los carcinomas testiculares, el antígeno carcinoembrionario en el cáncer de colon, la gonadotropina coriónica humana β en el coriocarcinoma y el carcinoma testicular, las inmonoglobulinas séricas en el mieloma múltiple, el CA 27-29 en el cáncer de mama y el antígeno prostático específico y la fosfatasa ácida prostática en el cáncer de próstata ^[26].

La incorporación de los biomarcadores en ensayos clínicos sobre el cáncer ha sido un avance importante en las últimas dos décadas de investigación sobre el cáncer y ha sido fundamental para aumentar nuestra comprensión del cáncer en todo el espectro de las lesiones tempranas de la enfermedad.

Dentro de los biomarcadores relacionados con el padecimiento del cáncer de próstata, se encuentran algunos metabolitos, dentro de los cuales podemos mencionar los aminoácidos como lo demuestran las investigaciones en los últimos años ^[27].

II.5 AMINOÁCIDOS

El término aminoácido define a cualquier molécula que contiene un grupo amino (NH_2) y un grupo ácido (COOH), los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés

biológico son los denominados α -aminoácidos, estos tienen el grupo amino y carboxílico unido al mismo átomo de carbono, llamado carbono alfa (α) (ver figura 7), además de poseer un átomo de hidrogeno y una cadena lateral distinta llamada grupo R ^[28].

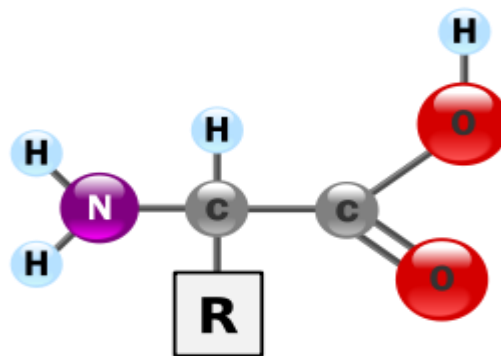


Figura 7. Estructura química de un α -aminoácido. ^[29].

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que se combinan para formar las proteínas. Estas moléculas son anfóteras; es decir, pueden actuar como ácidos o como bases, Los aminoácidos se clasifican en dos grupos:

- **Aminoácidos esenciales:** son aquellos que el propio organismo no puede sintetizar por sí mismo. Esto implica que la única fuente de estos [aminoácidos](#) en esos organismos es la ingesta directa a través de la [dieta](#). Las rutas para la obtención de los aminoácidos esenciales suelen ser largas y energéticamente costosas.
- **Aminoácidos no esenciales:** son no esenciales todos [aminoácidos](#) que el cuerpo los puede sintetizar, y que no necesita hacer la ingesta directa en una dieta.

Otro tipo de clasificación para los aminoácidos, es de acuerdo con su capacidad para interaccionar con el agua. Utilizando este criterio, pueden distinguirse cuatro clases: apolares neutros, polares neutros, ácidos y básicos. ^[28]

II.5.1 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Existen diferentes técnicas para el análisis de aminoácidos en muestras de orina y sangre. Sin embargo, las técnicas que se usan con mayor frecuencia son: cromatografía de intercambio iónico, Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) con detección de fluorescencia y UV-Visible, espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (MS) acoplada con métodos cromatográficos, como la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) y la Cromatografía de Gases (GC). ^[30] es importante recalcar que para determinar aminoácidos por técnicas cromatográficas se debe llevar a cabo una reacción previa al análisis, esta reacción recibe el nombre de derivatización.

II.5.2 DERIVATIZACIÓN

La derivatización implica un cambio químico entre un analito y un reactivo para cambiar las propiedades físicas y químicas de dichos analitos. El uso de la derivatización en HPLC se emplea con los siguientes fines:

1. Mejorar la sensibilidad.
2. Cambiar la estructura molecular o polaridad del analito para mejorar la cromatografía.

3. Cambiar la matriz para mejorar la separación.
4. Estabilizar analitos sensibles.

Idealmente, una reacción de derivatización debe ser rápida, cuantitativa, y producir la mínima cantidad de subproductos. Un exceso de reactivo derivatizante no debe interferir con el análisis o debe ser removido con facilidad por la matriz de la reacción.

La introducción de una reacción pre o post-columna adiciona una complejidad más a otras fuentes de error en el análisis, e incrementa el tiempo total de análisis. Aunque este procedimiento puede ser automatizado, el analista debe garantizar que los pasos de la derivatización son cuantitativos y que impurezas adicionales no sean introducidas en el análisis. Aunque la derivatización tiene algunos inconvenientes, puede todavía ser requerida para resolver una separación específica o un problema de detección ^[41].

II.5.3 Sensibilidad

En cromatografía de gas, la derivatización es generalmente usada para mejorar la volatilidad o cambiar la polaridad de un analito, mientras que la derivatización en HPLC es usada frecuentemente para aumentar la sensibilidad de los analitos y cambiar su estructura molecular. HPLC ofrece un gran rango en métodos de separación (fase normal, fase reversa, quiral e intercambio iónico) y tipos de fases estacionarias y fases móviles modificables que pueden usarse para minimizar la quimisorción y adsorción.

La primera consideración en la selección de un método de derivatización en HPLC, es determinar cual tipo de detección es mejor. Adicionalmente, es necesaria la selección de una derivatización pre o post columna. Muchas clases de compuestos

pueden ser derivatizados incluyendo ácidos, alcaloides, aminas, hidroxí compuestos y esteroides.

Los dos tipos de derivatización más comunes son: la adición de un cromóforo o fluoróforo, estos permiten la detección de un analito que no puede ser analizado en su forma normal o para incrementar su sensibilidad.

Las consideraciones generales en la selección de un reactivo derivatizante son:

1. El agente derivatizante debe ser estable.
2. El agente derivatizante y los sub-productos formados no deben ser detectables o deben ser separables del analito.
3. El analito debe reaccionar con el agente derivatizante, bajo condiciones convenientes.
4. Si es posible, el agente derivatizante no debe ser tóxico.
5. El procedimiento debe ser adaptable a la automatización ^[41].

II.5.4 Detección UV-Visible Y Fluorescencia

Típicamente el reactivo derivatizante utilizado para la detección UV-Visible debe tener dos grupos funcionales. Un grupo funcional controla la reacción del reactivo con el analito de interés y el segundo es utilizado para la detección UV. El cromóforo debe tener un gran coeficiente de absortividad molar, con una banda de absorción que pueda maximizar la detección y minimizar el ruido del equipo.

Además de todas las consideraciones que se deben tener en cuenta para los reactivos derivatizantes, los reactivos para la derivatización fluorescente requieren de un grupo fluoróforo que posea una intensa banda de absorción. Debido a las propiedades especiales requeridas para una fuerte respuesta fluorescente, hay pocos

reactivos para la derivatización fluorescentes, al contrario de lo que ocurre para la detección por UV-visible ^[41].

II.5.5 Derivatización Post-Columna

La derivatización post-columna es comúnmente realizada, usando una reacción en la cual, el analito es derivatizado después de la separación, pero antes de la detección. Las principales ventajas para la derivatización post-columna son: formación mínima de sub-productor, la reacción completa no es esencial siempre que sea reproducible y la cromatografía de analito no se vea afectada.

Las desventajas de la derivatización post-columna son, la complejidad añadida, tanto para el desarrollo de métodos, como para las aplicaciones de rutina. Consideraciones importantes son los requerimientos cinéticos y una posible incompatibilidad entre la fase móvil y el reactivo derivatizante ^[41].

II.5.6 Derivatización Pre-Columna

Hay muchas más ventajas para la derivatización pre-columna que para la post-columna, ya que la derivatización pre-columna tiene menores restricciones para el equipo y la reacción química; el analista puede realizar la derivatización, y luego transferir la muestra a su vial apropiado para el análisis. La derivatización pre-columna puede ser realizada manual o automáticamente ^[41].

II.5.7 DERIVATIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Existen varios reactivos que reaccionan con los aminoácidos dando compuestos que pueden utilizarse para análisis cualitativos y cuantitativos. Esto es lo que se denomina derivatización de aminoácidos. La derivatización de aminoácidos se utiliza como una forma de aumentar la detección selectiva y sensible de los mismos, este proceso puede ser llevado a cabo antes de la separación cromatográfica o después. Debería ocurrir cuantitativamente para producir productos sencillos para cada aminoácido y el reactivo no debe interferir. Los principales reactivos utilizados para la preparación de derivados de aminoácidos son: o-ftaldehído (OPA), fluorescamina, isocianato de fenilo, cloruro de dansilo, feniltiohidantoina (PTH) y ninhidrina.

El o-ftaldialdehído (OPA) es un reactivo clásico para la derivatización de aminas primarias. Este reactivo bifuncional reacciona con dos hidrógenos de la amina primaria para formar isoindoles, compuestos que son fluorescentes pero algo inestables. La reacción de los isoindoles con tioles forma derivados que son suficientemente estables para análisis por HPLC con detección de fluorescencia. La reacción requiere de un medio básico, que permite la remoción del hidrogeno en los pasos intermedios. Presenta altas velocidades de reacción a temperatura ambiente, y debido a la homogeneidad de la solución de reacción, los modernos automuestreadores tienen la capacidad de preparar estas derivatizaciones en los viales antes de la inyección. El uso exitoso de este derivatizante requiere el control de las condiciones, como buffer, volumen de reactivo, y volumen de metanol. Bajo optimas condiciones, es posible lograr un tiempo de reacción de 1 a 2 min y minimizar cualquier reacción secundaria no deseada. El OPA fue originalmente introducido como un reactivo alternativo de la ninhidrina en la derivatización post-columna y suministró un significativo incremento en la sensibilidad. La separación en fase reversa seguida de detección por fluorescencia,

constituye un método de detección rápido, sensible y selectivo para todos los aminoácidos con grupos amino primario. Aunque el OPA fue originalmente aplicado solamente para la derivatización post-columna, actualmente es ampliamente usado como un agente para pre-columna. Una desventaja del OPA reside en la relativa inestabilidad de sus derivados, lo cual no es de gran dificultad en la técnica de derivatización en post-columna ^[42]. En la siguiente figura se muestra más claramente la reacción que se lleva a cabo entre el o-ftaldialdehído/2-mercaptoetanol y los α -aminoácidos.

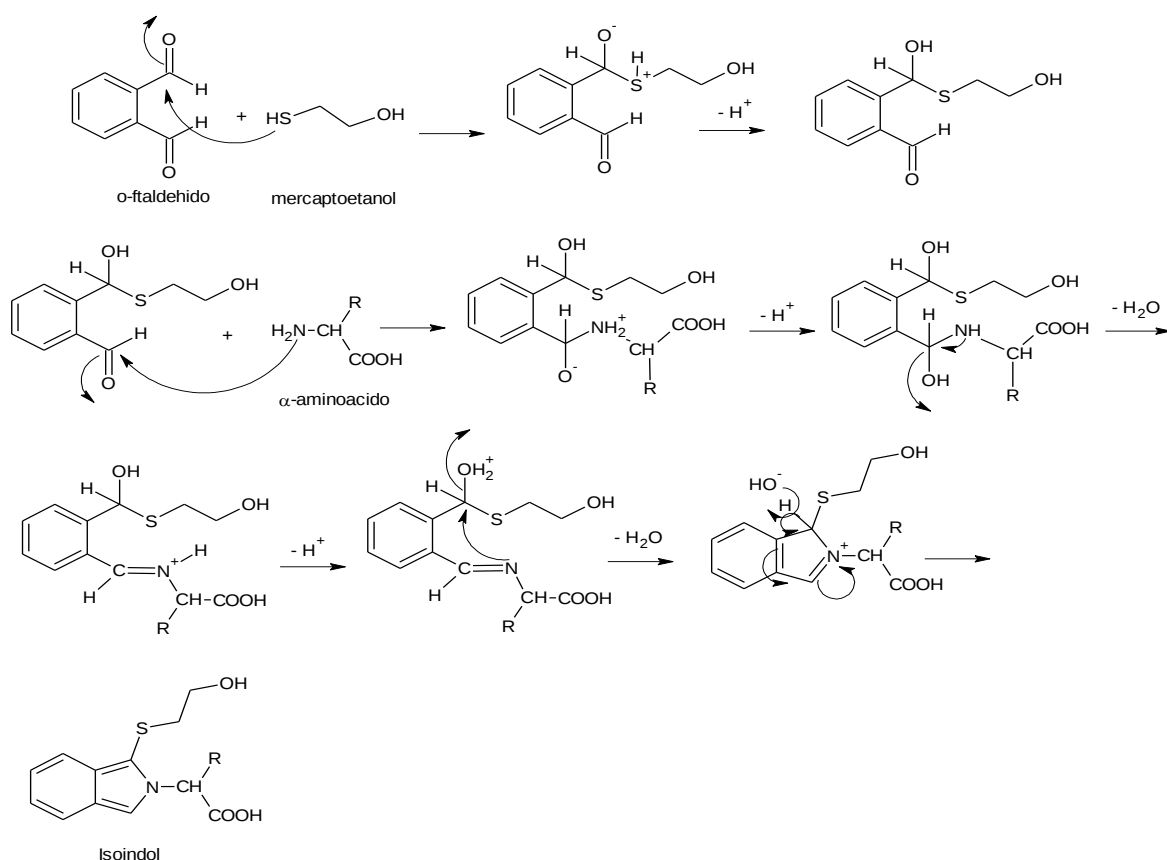


Figura 8. Reacción de derivatización entre el OPA/2-ME con α -aminoácidos

Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC ha sido empleada para el análisis de aminoácidos, usando como agentes derivatizantes cloruro de dansil o feniltiohidantoina (PTH); esta técnica emplea una columna de fase reversa ofreciendo mayor eficiencia, facilidad de uso y velocidades de flujo más altas que la técnica convencional de intercambio iónico. El análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia para aminoácidos empleando dansil o PTH como derivatizantes ha sido relativamente rápida, mostrando buena sensibilidad y eficiencia, sin embargo esta técnica no parece mostrar suficiente especificidad (debido a la reactividad no específica) para aminoácidos en fluidos biológicos complejos. El O-ftaldialdehído/2-mercaptaetanol reacciona específicamente con aminas primarias para formar productos que pueden ser detectados con relativa especificidad y sensibilidad con un detector de fluorescencia. o-ftaldialdehído/2-mercaptoetanol fue usado como derivatizante para aminas en muestras de orina, tejido y plasma obteniéndose buena sensibilidad para cromatografía líquida de alta eficiencia con fase reversa ^[43].

II.6. CREATININA

Es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina (nutriente útil para los músculos). Se trata de un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que habitualmente produce el cuerpo en una tasa constante, y que normalmente filtran los riñones excretándola en la orina. La medición de la creatinina es el modo más simple de monitorear la función de los riñones ^[31].

La cantidad de algunas sustancias excretadas por la orina depende de varios factores importantes: como las enfermedades, lesiones, stress emocional y ejercicios rigurosos, la creatinina es una de esas sustancias. La creatinina presenta unas ciertas

características, entre ellas podremos nombrar su producción diaria, la cual es directamente proporcional al contenido de creatinina del cuerpo (cerca del 2%), que es la principal causa por la que se puede usar como parámetro de normalización. En ocasiones cuando no es posible la toma de muestra de orina de 24 horas la determinación de la creatinina ayuda para solventar en parte este problema. ^[32]

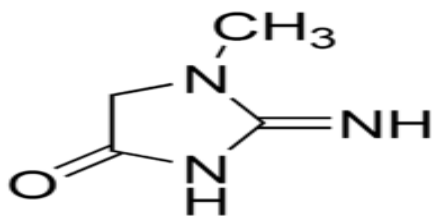


Figura 9. Estructura química de la creatinina. ^[33]

II.6.1. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CREATININA

El método por excelencia en la parte clínica para la determinación de la creatinina no solo en orina sino también en sangre se conoce como el método de Jaffe, el cual consiste en una reacción entre la creatinina y el ácido pícrico en un medio fuertemente básico de hidróxido de sodio. El producto de la reacción es un compuesto coloreado (naranja) el cual se puede medir fácilmente por espectrometría UV-Visible. ^[34]

II.7. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

En 1906 el botánico ruso Tswett definió la cromatografía como un método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente dentro de un sistema fluyente. Recientemente la IUPAC define la cromatografía de forma más amplia, como un método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil.

La cromatografía permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos, la retención y el desplazamiento; el primero es un efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido adherido a un soporte sólido como la alúmina, sílice o resinas poliméricas químicamente modificadas, y el segundo es un efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido, gas o un fluido supercrítico. El principio básico de la separación se fundamenta en una serie de sucesos de equilibrio entre una fase móvil y la fase estacionaria, el equilibrio dependerá de las propiedades físicas y químicas de los componentes ^[36].

Una clasificación fundamental de los métodos cromatográficos se basa en los tipos de fase móvil y estacionaria implicados, y en la clase de equilibrios involucrados en la transferencia de los solutos entre las fases: cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquido (CL) y cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) ^[36].

Haciendo referencia a la técnica en estudio cromatografía líquida, esta hace referencia al método en el cual la separación se produce dentro de una columna empacada. El material de empaque puede ser un sólido con capacidad adsorbtiva o de

exclusión, o un soporte revestido; en ella se usa una fase líquida como eluyente. La cromatografía líquida se puede realizar utilizando dos métodos conocidos:

1. El procedimiento clásico desarrollado por Tswett, denominado cromatografía de columna abierta, en el cual se deja fluir la fase móvil a través de la columna empacada, bajo la influencia de la gravedad.
2. El procedimiento en el cual se fuerza la fase móvil a través de la columna empaquetada bajo alta presión. Este último método se denomina cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

II.7.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada actualmente debido a su sensibilidad, a su adecuación para realizar determinaciones cuantitativas exactas a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, plaguicidas, y algunas sustancias inorgánicas)

La cromatografía líquida de alta eficiencia se encuentra dentro de la cromatografía de elución. En ésta un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases ^[37].

II.7.1.1 Ventajas y desventajas

Las principales ventajas son:

- Buena sensibilidad.
- Fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas.
- Idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles.
- Alta resolución.
- Gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia.

Algunas limitaciones o desventajas son:

- Instrumentación relativamente costosa.
- Se requiere de operarios con experiencia ^[38].

II.7.1.2. Modos de separación en HPLC

Existen tres características principales que se pueden usar para conseguir una separación en HPLC: la polaridad, la carga eléctrica y el tamaño molecular.

- Separación basada en la polaridad:

En este tipo de separación el grado de retención de una molécula concreta estará determinado por los grupos funcionales principales y por su disposición espacial, en función de lo cual, habrá moléculas altamente polares y altamente apolares. Existen dos tipos de separaciones basadas en la polaridad, entre las que se encuentra la cromatografía de fase normal y la cromatografía de fase inversa.

En la cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar. Un ejemplo sería el uso de la sílica como fase estacionaria y hexano como fase móvil. De esta manera los componentes no polares eluyen primero de la columna, mientras que los polares quedan más tiempo retenidos.

En la cromatografía de fase reversa o inversa, se usa una fase estacionaria no polar, como por ejemplo la C18, y una fase móvil polar, un ejemplo sería una disolución acuosa, acetonitrilo o metanol. De esta forma los compuestos no polares quedarán retenidos en la columna, mientras que los polares saldrán rápidamente. Este tipo de cromatografía es la más utilizada hoy en día, debido a su mayor reproducibilidad y a sus amplias aplicaciones. Se pueden analizar una amplia variedad de compuestos entre los cuales se pueden mencionar los farmacéuticos, hidrocarburos y algunas compuestos de interés biológico.

- Separación basada en la carga eléctrica

En esta separación la regla básica aplicable es que las moléculas con carga eléctrica de igual signo se repelen mientras que las moléculas con carga eléctrica de distinto signo se atraen entre sí. Las fases estacionarias empleadas se caracterizan por el tipo de grupos funcionales ácidos como ácidos carboxílicos o básicos como aminas cuaternarias de sus superficies y por los tipos de iones que pueden atraer y retener.

- Separación basada en el tamaño molecular

En este tipo de separación se emplean fases estacionarias sintéticas con una distribución de poros en un rango amplio, que permite a los analitos entrar o ser excluidos del volumen de poro del empaquetamiento. Debido a esta distribución, las moléculas más pequeñas penetran en un mayor número de inter mientras que las más grandes sólo pasan entre las partículas, siendo eluidas con rapidez. ^[39].

II.7.1.3. INSTRUMENTACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS HPLC

Los componentes de un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se puede observar detalladamente en la figura 11.

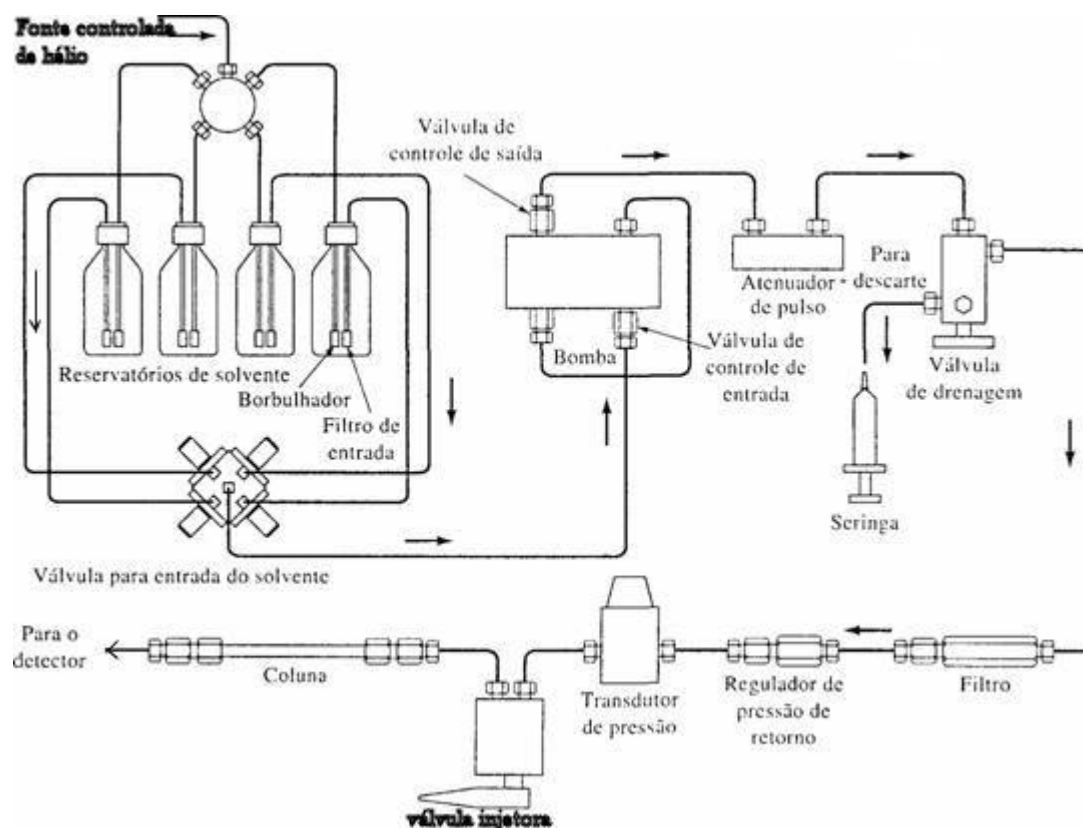


Figura 10. Equipo de cromatografía de líquidos HPLC ^[40].

- Sistema para el tratamiento de la fase móvil

El quipo de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio diseñados para contener los disolventes que se emplean como fase móvil. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos en general oxígeno y nitrógeno que interfieren formando burbujas en la bomba causando gravitación, afectando de esta manera la reproducibilidad del flujo de la fase móvil.

Un desgasificador puede consistir en una bomba de vacío, un sistema de agitación con ultrasonido o un sistema de purga, el cual puede ser parte integral del equipo cromatográfico o inclusive como un módulo aparte.

- **Sistema de bombeo de la fase móvil**

Un sistema de bombeo de HPLC debe ser capaz de generar elevadas presiones, producir un flujo libre de pulsaciones, conseguir un amplio intervalo de caudales con elevadas reproducibilidad y estar dotado de componentes resistentes a la corrosión. Los sistemas de bombeo en HPLC emplean bombas para impulsar a la fase móvil, se utilizan tres tipos de bombas: recíprocas, de desplazamiento y neumáticas. Por lo general son rigurosos y deben cumplir los siguientes requisitos ^[37].

Para que el sistema de bombeo funcione correctamente es esencial que las fases móviles no contengan gases disueltos ni partículas en suspensión. Para ello se suelen utilizar desgasificadores, que consisten en sistemas de bombeo por vacío, sistema de destilación, dispositivos para agitar los disolventes o sistemas de purga que permiten arrastrar los gases disueltos.

Como parte de sus sistemas de bombeo, muchos instrumentos comerciales están equipados con dispositivos controlados por computadora que permiten medir la tasa de flujo mediante la determinación de la caída de presión a través de un constrictor

colocado en la salida de la bomba. Cualquier diferencia entre la señal y un valor preestablecido se utiliza para aumentar o disminuir la velocidad del motor de la bomba. Asimismo, la mayor parte de los instrumentos puede variar la composición del solvente sea de manera continua o en forma escalonada.

- **Sistema de inyección de muestra**

Los sistemas de inyección hacen posible la introducción de la muestra sin despresurizar el sistema y sin sobrecargar la columna, el método más ampliamente utilizado para la introducción de muestra utiliza bucles de muestras. Estos dispositivos son normalmente una parte integrada del equipo cromatográfico y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestras desde 5 a 500 μL . También existen válvulas de inyección de micromuestras, con bucles con volúmenes de 0,5 a 5 μL .

La inyección de la muestra es el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos. Por ello, los volúmenes de muestra que se emplean son muy pequeños, en el orden de los microlitros. Además, es necesario que la muestra se filtre antes de introducirla a la columna, para evitar que partículas suspendidas en la solución puedan taponar la columna o dañar el sistema de detección ^[34]. Por otro lado, la mayor parte de los sistemas de HPLC utilizan inyectoros automáticos. Dichas unidades tienen la capacidad de inyectar muestras en el cromatógrafo de líquidos a partir de viales que están en un carrusel. Por lo general, contienen rizados de muestreo para inyectar volúmenes de muestra que pueden ir desde menos de 1 μL hasta más de 1 mL. ^[37]

- **Columnas**

Las columnas son un elemento esencial para la separación cromatográfica. La fase estacionaria está contenida en un tubo con terminaciones, aislada por ambos lados, que debe ser capaz de contener la presión generada en su interior durante su fabricación y durante su uso. Las columnas normalmente son de acero inoxidable o de material polimérico, de diámetro interno uniforme. El diámetro interno de las columnas de escala analítica es de 4 a 10mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 o 10 micrones, con una longitud entre 5 y 30 cm. Generalmente son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. Los empaquetados más comunes son de partículas de sílice pero también se usa la alúmina, polímeros porosos y resinas de intercambio iónico ^[37].

En cromatografía de líquidos se utiliza dos tipos básicos de rellenos: peliculares y de partículas porosas. Las partículas peliculares originales eran cuencas esféricas de vidrio o de polímero no poroso cuyos diámetros característicos eran de 30 a 40 μm , en la superficie de estas se depositaba una fina capa porosa de sílice, alúmina o de resina sintética de poliestireno-divinilbenceno, o bien, una resina de intercambio iónico. Los rellenos de partículas porosas característicos para cromatografía de líquidos están formados por micropartículas porosas cuyos diámetros varían entre 3 y 40 μm

Por lo general para aumentar la vida de una columna analítica, se coloca una precolumna que elimina no solo la materia en suspensión y los contaminantes de los solventes, sino también los componentes de la muestra que se unen de manera irreversible a la fase estacionaria, la composición del relleno de la precolumna debería ser semejante al de la columna analítica, pero el tamaño de la partícula es mayor para minimizar la caída de presión.

Control de la temperatura de la columna

En muchas aplicaciones no se necesita un control riguroso de la temperatura, por esa razón la columna trabaja a temperatura ambiente. Sin embargo, muchas veces se obtienen mejores cromatogramas, siendo más reproducibles cuando la temperatura de la columna se mantiene constante. La mayoría de los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que controlan la temperatura con decimas de grados, desde la temperatura ambiente hasta 60 °C. Muchos operadores de cromatogramas consideran que el control de la temperatura es esencial para lograr separaciones reproducibles.^[37]

- **Detectores**

Un detector es un instrumento con la capacidad de percibir la presencia de un compuesto y enviar la señal eléctrica correspondiente a un ordenador de registro. Las características ideales de un detector son múltiples, se pueden citar la alta sensibilidad, respuesta lineal para los diferentes analitos, reproducibilidad y un tiempo de respuesta corto. Además el detector presente una respuesta semejante para todos los analitos, o alternativamente una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.

Según las características y concentraciones de los compuestos implicados en la separación cromatográfica se puede escoger el detector más adecuado para cada aplicación. Los detectores en cromatografía de líquidos pueden ser clasificados en dos tipos básicos: detectores basados en una propiedad de la solución, los cuales responden a una propiedad del efluente, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad que se modifica por la presencia de los analitos y detectores

basados en una propiedad del soluto, que responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia en el UV, fluorescencia o corriente límite, que no son inherentes a la fase móvil ^[37].

Los detectores usados para HPLC son UV-Visible, fluorescencia, espectrometría de masas, índice de refracción y electroquímica. A continuación se describen brevemente las principales los detectores más utilizados en cromatografía líquida de alta eficiencia.

- Detectores Ultravioleta-Visible (UV-Vis): miden la absorbancia de los efluentes de una columna cromatográfica. Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce la intensidad. Para comparar las intensidades de los haces se usan detectores fotoeléctricos contrastados. También se utilizan detectores de arreglo de diodos que permiten la recolección simultánea de cromatogramas a diferentes longitudes de onda en una sola corrida. Los detectores espectrofotométricos de ultravioleta son los instrumentos de diodos en serie. En cualquier caso, el cromatograma consiste en una grafica de la absorbancia (logaritmo del cociente de las dos señales transducidas) en función del tiempo.
- Espectrometría de masas: la combinación de cromatografía de líquidos de alta eficiencia y la espectrometría de masas ocasiona una alta selectividad porque los picos no resueltos se pueden aislar al supervisar solo una masa seleccionada. La técnica CL-MS tiene la capacidad de proporcionar huellas dactilares de un producto particular sometido a elución. Esta combinación también proporciona masa molecular, información estructural y análisis cuantitativo exacto.
- Detector de fluorescencia, la fluorescencia se detecta por medio de un transductor fotoeléctrico colocado a 90° respecto al haz de excitación. Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio y uno

o más filtros para aislar una banda de la radiación emitida. Los instrumentos más complejos consisten en una fuente de xenón y emplean un monocromador de red para aislar la radiación fluorescente. La fluorescencia inducida por rayo láser se utiliza debido a su sensibilidad y selectividad.

Una ventaja inherente de los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad, que resulta ser mayor por más de un orden de magnitud que la mayoría de los procedimientos de absorción.

En cromatografía de líquidos se ha aprovechado esta ventaja para la separación y determinación de los componentes fluorescentes de las muestras. Los compuestos fluorescentes suelen estar relacionados con el análisis de materiales de interés farmacéutico, productos naturales, muestras clínicas y productos del petróleo. La cantidad de especies fluorescentes aumenta si se tratan previamente las muestras con reactivos que originan derivados fluorescentes.

CAPÍTULO III

ANTECEDENTES

Robert y col 1973 ^[44] Reportan la determinación de aminoácidos en muestras de orina hidrolizadas, por cromatografía de gases con detección de llama. Los aminoácidos fueron derivatizados empleando una mezcla de piridina/anhídrido acético. Los esteres N-propil-N-acetil obtenidos fueron separados y se cuantificaron 16 aminoácidos en una corrida cromatográfica. Reportan un coeficiente de variación inferior al 5%.

Macgregor y col 1976 ^[45] Estudiaron la excreción de Glicina, Isoleucina, Leucina, Metionina y Ácido Aspártico en muestras de orina por cromatografía de gases. Analizaron 16 sujetos sanos y 48 pacientes con cáncer de próstata, con la finalidad de relacionar la excreción de estos aminoácidos en la orina con el padecimiento de esta enfermedad. No encontraron diferencias significativas de los aminoácidos más comúnmente excretados entre los grupos de pacientes normales y los pacientes con etapas diferentes de la enfermedad debido a las grandes variaciones de la excreción dentro de los grupos en su conjunto. Sin embargo, con pocas excepciones, el grupo de pacientes con cáncer excreta isoleucina mientras en los sujetos normales no se detectó en las mismas condiciones experimentales. Estos hallazgos sugieren que la medición de la excreción urinaria de isoleucina puede ser un parámetro útil para la detección precoz del cáncer de próstata.

Macgregor y col 1977 ^[46] Realizaron el mismo estudio [cita 1976] antes descrito por cromatografía de gases, esta vez con 29 individuos sanos y 118 pacientes con carcinoma de vejiga. Obtuvieron como resultado que los pacientes con carcinoma de

vejiga excretaron leucina e isoleucina en elevadas concentraciones. Conjuntamente con este estudio, desarrollaron un programa matemático para la determinación de grupos variables de aminoácidos, cuyos resultados sugirieron que la excreción de glicina, leucina, prolina y ácido glutámico en los hombres y las concentraciones de valina, serina, ácido aspártico, fenilalanina y lisina en las mujeres varían de acuerdo a la invasividad de la enfermedad.

Stobaugh y col 1983 ^[47] Estudiaron la cinética de degradación de los derivados isoindoles fluorescentes formados en la reacción entre el o-ftaldialdehído (OPA) y el 2-mercaptoetanol (2-ME) con una serie de aminos primarias, determinaron la estabilidad de estos isoindoles en presencia de un exceso de OPA y de 2-ME, encontrándose que un exceso de OPA acelera la degradación de los isoindoles mientras que el exceso de 2-ME no afecta a los mismo.

Carducci y col 1996 ^[48] Plantearon un método automatizado y sensible en HPLC para el análisis de aminoácidos primarios y secundarios en muestras de orina. Emplearon como agentes derivatizantes el o-ftaldialdehído-ácido-3-mercaptopropanoico para aminoácidos primarios y el cloroformiato de 9-fluorenilmetilo para aminoácidos secundarios. El OPA-3MPA fue seleccionado como el agente derivatizante, debido a la rapidez de la reacción a temperatura ambiente llevada a cabo en soluciones acuosas. Optimizaron las condiciones para la separación satisfactoria de 40 aminoácidos en 92 min. Obtuvieron una correlación lineal entre las áreas de los picos y las concentraciones en un rango de 10-400 μM y de 10-100 μM , Un coeficiente de correlación de 0,999 para todos los aminoácidos. Límite de detección para los diferentes aminoácidos oscila de 50 a 500 fmol. El RSD del tiempo de retención para todos los aminoácidos estuvo por debajo del 0,5%. El método fue aplicado para el diagnóstico de trastornos metabólicos de los aminoácidos.

Van der Graaf, y col. 2000 ^[49] Analizaron muestras de tejidos humanos prostáticos, utilizando Resonancia Magnética Nuclear de Protones (H^1 RMN) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Los resultados obtenidos por HPLC, indican que los tejidos de próstata normal y con hiperplasia benigna de próstata se caracterizaron por un alto contenido de espermina, estos niveles de espermina, los cuales se redujeron en las muestras de tejido tumorales, especialmente en el carcinoma de próstata con metástasis. Lo cual indica que la espermina podría usarse como un posible biomarcador para el comportamiento maligno; mientras que el estudio de espectroscopia de RM demostró que es posible detectar espermina por resonancia en material de biopsia prostática.

Tsuruta y col 2007 ^[50] Desarrollaron un método para determinar N-etilglicina, Prolina e Hidroxiprolina en muestras de orina, empleando la derivatización pre-columna con el reactivo fluorescente cloruro de 4-(5,6-dimetoxi-2-ftalimidinilo)-2-metoxifenilsulfonil) (DMS-Cl). El estudio fue realizado para determinar una relación entre estos analitos y enfermedades óseas. La excreción de N-etilglicina fue relacionada con el padecimiento de cáncer metastasico.

Serkova y col 2008 ^[51] Utilizaron Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para analizar secreciones prostáticas de pacientes con cáncer de próstata y sujetos sanos, encontrando entre los metabolitos estudiados, que la espermina, myo-inositol y citrato mostraron concentraciones de 2 a 3 veces inferior en pacientes con cáncer de próstata, obteniéndose estos con una especificidad de 74, 51 y 34% respectivamente.

Gatti y col 2008 ^[52] Emplearon la derivatización pre-columna con un agente derivatizante fluorescente fanquinona (4,7-feniltrolina-5,6-diona) por cromatografía líquida para determinar aminoácidos primarios en muestras biológicas. Los aminoácidos derivatizados resultantes fueron identificados y cuantificados. Esta investigación fue realizada con el propósito de validar y aplicar el método para la determinación de una variedad de aminoácidos directamente en la orina. Los límites de detección y cuantificación estuvieron en un rango de 10-450 y 35-1400 fmol respectivamente.

Sreekumar y col 2009 ^[53] Emplearon Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG/EM) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia-Espectrometría de Masas (HPLC-EM) para estudiar muestras biológicas como tejido, sangre y orina de individuos con cáncer de próstata localizado, hiperplasia prostática benigna e individuos sanos. En el estudio encontraron más de 1126 metabolitos en 262 muestras clínicas, relacionadas con el cáncer de próstata. Sarcosina, un derivado N-metilo del aminoácido glicina fue el biomarcador que más se relacionó con la presencia o no del cáncer de próstata, encontrándose que su concentración fue de 79 y 42% para muestras de cáncer de próstata metastasico y cáncer de próstata localizado respectivamente. En las muestras de los individuos sanos no se encontraron niveles detectables de sarcosina.

Hernández 2010 ^[54] comparó las concentraciones de isoleucina, en orina de pacientes con cáncer e individuos sanos. El estudio comprende 24 muestras de individuos entre 47 y 83 años de edad. Para la determinación de isoleucina se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia con derivatización precolumna con o-ftaldialdehído (OPA). El límite de detección encontrado para la isoleucina fue de 9,55 $\mu\text{mol/L}$ y el de cuantificación 27,78 $\mu\text{mol/L}$. Encontraron que la isoleucina fue excretada por el 62,5% de los pacientes a los que les fue realizada biopsia prostática en un rango de

concentración de (559-1215) $\mu\text{mol/L}$, mientras que en los individuos del grupo sano no se les detectó.

Bianchi y col/ 2011 ^[55] Determinaron sarcosina y N-etilglicina en orina y sedimentos urinarios, analizaron 56 muestras, 13 de sujetos sanos, 10 con Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y 33 sujetos con cáncer de próstata clínicamente localizado. Emplearon para el análisis la derivatización de la sarcosina utilizando cloroformiato de hexilo seguido por la inmersión en fase sólida de microextracción directa y el análisis en cromatografía de gases-espectrometría de masas. Los resultados mostraron que los niveles promedio y rangos de sarcosina/creatinina en orina fueron 103 (24-233), 137 (64-298) y 267 (74-6900) mg/g para sujetos sanos, con hiperplasia (HPB) y con cáncer de próstata localizado respectivamente; obtuvieron los valores más altos de sensibilidad (7%) y una buena repetitividad con un CV siempre inferior al 7%. En conclusión sugirieron el uso de sarcosina como un potencial biomarcador urinario para detectar el cáncer de próstata.

Montes 2011 ^[56] Analizó isoleucina en muestras de orina de 11 pacientes con cáncer de próstata, 17 con hiperplasia prostática o prostatitis y 7 individuos sanos. Utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia como técnica de análisis y derivatización precolumna con o-ftaldialdehído OPA. Encontraron que el 57,1% de los pacientes sometidos a la biopsia prostática excretaron isoleucina en un rango de 17-1541 $\mu\text{mol/L}$, mientras que el grupo de pacientes sin afección en la próstata, no se detectó isoleucina en la orina. El método resultó sensible con un límite de detección y cuantificación de 17 y 57 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente.

Shamsipur y col 2013 ^[57] Desarrollaron y validaron un método para la determinación de metabolitos, como biomarcadores del cáncer de próstata en muestras de orina, entre los metabolitos de estudio se encontraban la sarcosina, alanina, leucina y prolina. Las muestras fueron tomadas de 12 pacientes con cáncer de próstata, 16 hombres sanos y 4 mujeres. Utilizaron como métodos de análisis una Derivatización con Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DDLLME) combinado con cromatografía de gases-espectrometría de masas y cromatografía líquida-espectrometría de masa. Obtuvieron para los sujetos sanos una concentración promedio de sarcosina de 380 µg/L con un rango de 280-650 µg/L y para los pacientes con cáncer de próstata la concentración promedio fue de 450 µg/L con un rango de 320-710 µg/L. Los límites de detección encontrados bajo las condiciones optimizadas para los aminoácidos, están en un rango de 0,05-0,1 ng/mL. El método mostró una buena linealidad (coeficientes de correlación >0,997). Los autores concluyen que este protocolo proporciona una herramienta rápida, simple y selectiva para cuantificar sarcosina y metabolitos endógenos en muestras de orina humana, así como para el diagnóstico del cáncer de próstata.

Esta revisión bibliográfica, permite resaltar la importancia de la búsqueda de biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz del cáncer de próstata; como se pudo observar en la bibliografía mostrada, se han encontrado algunas moléculas que pueden ser relacionadas con patologías de la próstata, entre las que se encuentran: myo-inositol, espermina y citrato e igualmente se ha encontrado relación entre algunos aminoácidos y sus metabolitos con el padecimiento del cáncer de próstata, como lo son la isoleucina, sarcosina y etilglicina. En este sentido, es de particular interés continuar con la búsqueda de potenciales marcadores para el cáncer de próstata, en especial, aminoácidos que se puedan relacionar con este padecimiento; mediante la utilización de técnicas de análisis que pueda ser accesibles a laboratorios clínicos como HPLC.

CAPITULO IV

OBJETIVOS

IV.1. GENERAL

Evaluar la excreción de aminoácidos en la orina como posibles biomarcadores del cáncer de próstata.

IV.2. ESPECÍFICOS

Seleccionar tres grupos de individuos para el estudio; el primero, grupo control o pacientes sanos; el segundo, pacientes con hiperplasia prostática y el tercero pacientes con cáncer de próstata clínicamente diagnosticado.

Optimizar las condiciones instrumentales para la separación de los aminoácidos excretados en la orina por cromatografía líquida de alta eficiencia.

Identificar y cuantificar los aminoácidos excretados en las muestras de orina.

Evaluar si existe diferencias estadísticamente significativas de los niveles de los aminoácidos en la orina de los tres grupos de individuos bajo estudio.

CAPITULO V

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

V.1. INSTRUMENTACIÓN

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC WATERS con detector de Fluorescencia WATERS 474, automuestreador WATERS 717plus y bomba WATERS 600s; Columna WATERS, symemtry C₁₈, 5 µm (4,6 x 250mm)

La data generada se procesó empleando el software de cromatografía EMPOWER 2154 versión 2.

Para la obtención de los valores de creatinina se empleó un espectrofotómetro de UV- visible de doble haz, marca THERMO ELECTRON CORPORATION GENESYS 10 UV

Para la obtención del agua desionizada se empleó el desionizador de agua Thermo Barnstead NANO PURE UV, marca ULTRAPURE WATER SYSTEM (USA).

V.2. REACTIVOS

La pureza de los reactivos empleados fue grado HPLC. En la preparación de todas las soluciones se utilizó agua desionizada de 18 mΩ (Sistema Nanopure Barnstead) y grado Mili- Q (Milipore)

V.2.1. FASE MÓVIL

Para la separación cromatográfica de los metabolitos se emplearon las siguientes disoluciones:

S_A: solución buffer (pH: 6,84) de acetato de sodio (AnalaR) 60mM / ácido acético (DE-HAËN)

S_B: acetonitrilo (Sigma-Aldrich) / solución buffer pH: 5,45 de acetato de sodio (100mM) / ácido acético /metanol (Sigma-Aldrich) con la proporción 74,5:21:4,5.

V.2.2. SOLUCIONES PATRÓN

Los patrones de aminoácidos (Biochemical) Ácido Aspártico (Asp), Serina (Ser), Arginina (Arg), Leucina (Leu) e Isoleucina (Ile) para la elaboración de la curva de calibración, se prepararon como se indica en la tabla 3. Las soluciones madre de los aminoácidos se prepararon disolviendo la cantidad pesas en buffer de borato pH 10 (Merck).

Tabla 3. Soluciones patrón de los aminoácidos.

Aminoácidos	Masa [g $\pm$ 0,0002]	Volumen de enrase [mL $\pm$ 0,05]	Concentración Madre [mmol/L]
Ácido Aspártico	0,0130	50,00	1,95 $\pm$ 0,09
Serina	0,0176	50,00	3,3 $\pm$ 0,3
Arginina	0,0272	50,00	3,1 $\pm$ 0,3
Isoleucina	0,0132	50,00	2,0 $\pm$ 0,1
Leucina	0,0145	50,00	2,2 $\pm$ 0,1

V.2.4. DERIVATIZANTE

Se utilizó como reactivo de etiquetaje o-ftaldialdehído (OPA) disolviéndose 0,1813 g de OPA en 2mL de metanol y enrazándose con buffer de borato pH 10 hasta 10 mL, de esta disolución se tomó diariamente 1mL y se le adicionó 20 μ L de 2-mercaptoetanol. La concentración final del agente derivatizante fue de $(18,13 \pm 0,02)$ mg/mL

V.2.5 MUESTRAS

Las muestras fueron recolectadas en el Hospital Universitario de Caracas y congeladas a -22°C , estas muestras fueron divididas de la siguiente manera:

Grupo control: las muestras de orina que conforman este grupo son las de pacientes que tuvieron valores de PSA menores a 2 ng/mL, de manera que se consideran inicialmente pacientes sano.

Grupo con hiperplasia prostática: pertenecen a este grupo las muestras de orina de pacientes que presentaron inflamación de próstata, sin presentar cáncer en la biopsia previamente realizada.

Grupo con cáncer de próstata: para este grupo de muestras se realizó un seguimiento a los pacientes con un PSA alto en la sangre y a los cuales al realizarle una biopsia se les diagnóstico con de cáncer de próstata.

V.3. PROCESO DE DERIVATIZACIÓN

Para llevar a cabo el proceso de derivatización se mezcló 100 μL de la muestra de orina, 50 μL de OPA-2ME y se enrazó hasta 500 μL con buffer de borato a pH 10 ^[54].

V.4. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA SEPARACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

Para la separación de los aminoácidos a estudiar en la orina; fue seleccionado el método reportado por Carducci ^[48], a excepción del volumen de inyección, el cual fue modificado a 10 μL . En la tabla 4 se muestran el programa de elución reportado por Carducci ^[48].

Tabla 4. Programa de elución para la separación de los aminoácidos ^[48].

Tiempo (min)	%S _B	Flujo (mL/min)
0	0,0	0,8
7	5,6	0,8
9	6,2	0,8
21	6,2	0,8
28	7,7	0,8
35	7,7	0,8
39	8,0	0,8
42	9,0	0,8
48	9,5	0,8
49	16,0	0,8
50	16,0	0,8
70	18,0	0,8
77	22,0	0,8
85	28,0	0,8
94	32,0	0,8
99	100,0	0,8
100	0	0,8

Con la finalidad de evaluar las condiciones seleccionadas de separación de los aminoácidos Ácido aspártico, Serina, Arginina, Isoleucina y Leucina, se procedió a llevar a cabo la derivatización pre-columna (apartado V.4), para luego realizar la inyección al sistema cromatográfico. Después de realizar varias corridas bajo las condiciones seleccionadas, se observó una baja resolución en la elución de los picos correspondientes a los aminoácidos y un tiempo de elución para los aminoácidos

isoleucina y leucina por encima de los 65 min; por tal motivo, fue necesario modificar las condiciones del gradiente de elución y flujo de la fase móvil.

Tabla 5. Programa de elución utilizado en la separación de los aminoácidos en la orina.

Tiempo (min)	% S _A	% S _B	Flujo (mL/min)
0	90	10	1,5
15	90	10	1,5
55	55	45	1,5

S_A: solución buffer (pH: 6,84) de acetato de sodio 60mM / ácido acético

S_B: acetonitrilo / solución buffer pH: 5,45 de acetato de sodio (100mM) / ácido acético /metanol (74,5:21:4,5 v/v)

V.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS EN LA ORINA

La identificación de los picos de los aminoácidos en la orina se realizó enriqueciendo la muestra con los respectivos aminoácidos a determinar. Para ello se mezcló 100 µL de la muestra de orina, 20 µL de la solución estándar de los aminoácidos, 50 µL de OPA-2MPA y se enrazó hasta 500 µL con buffer de borato a pH 10, y los cromatogramas se compararon con los de la muestra no enriquecida.

V.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

La determinación de la concentración de los aminoácidos en las muestras de orina se realizaron por el método de calibración directa. Cada curva de calibración se construyó realizando 5 diluciones de la solución estándar de cada aminoácido señaladas en el apartado V.3.2 y llevando a cabo el procedimiento de derivatización descrito en V.4. En las figuras 12, 13, 14, 15 y 16 se presentan las gráficas de las curvas de calibración de cada uno de los aminoácidos.

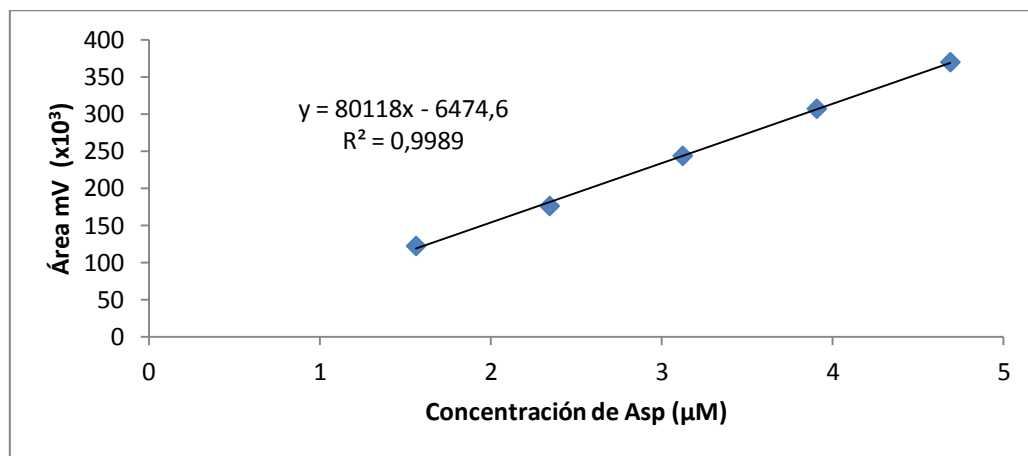


Figura 11. Curva de calibración de Ácido aspártico.

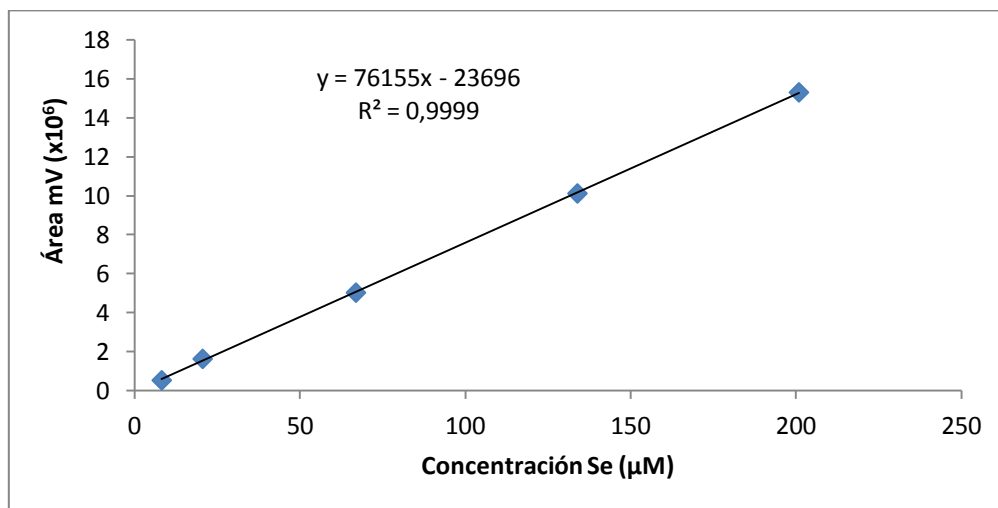


Figura 12. Curva de calibración de Serina

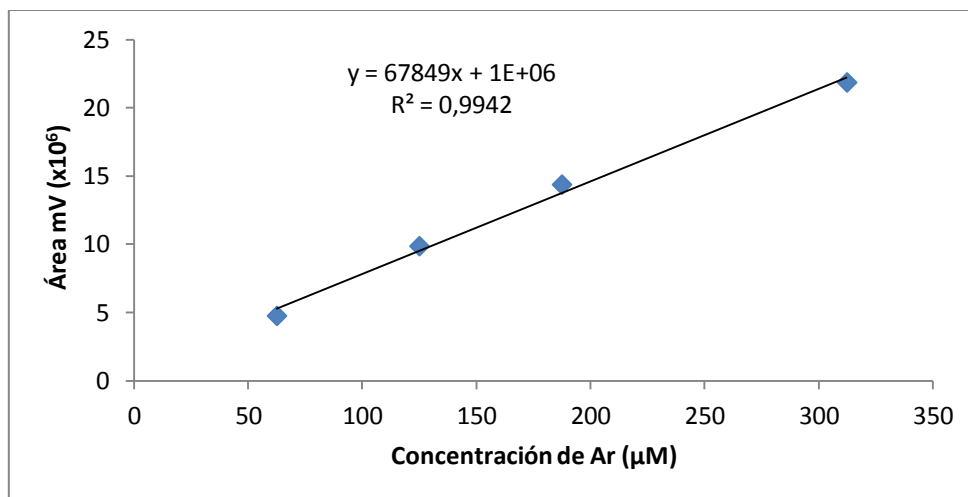


Figura 13. Curva de calibración de Arginina

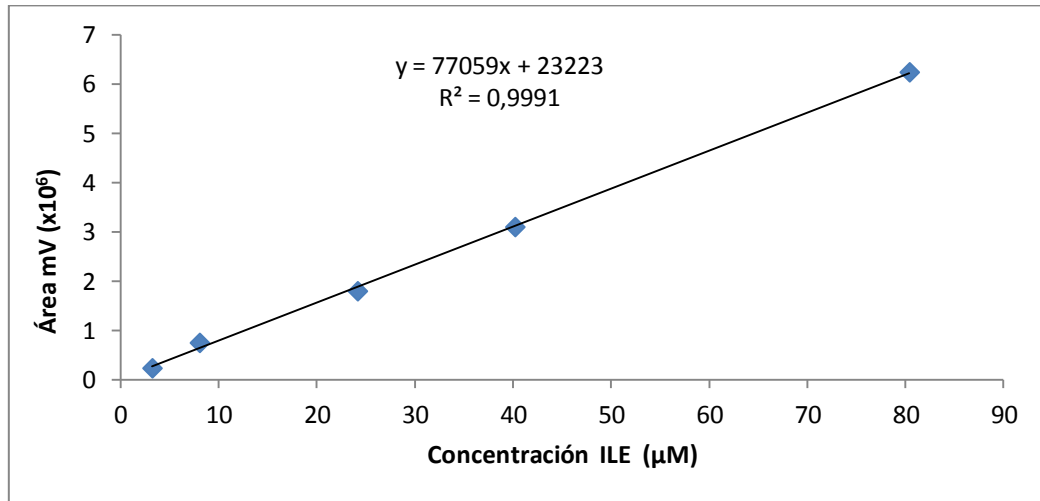


Figura 14. Curva calibración de Isoleucina.

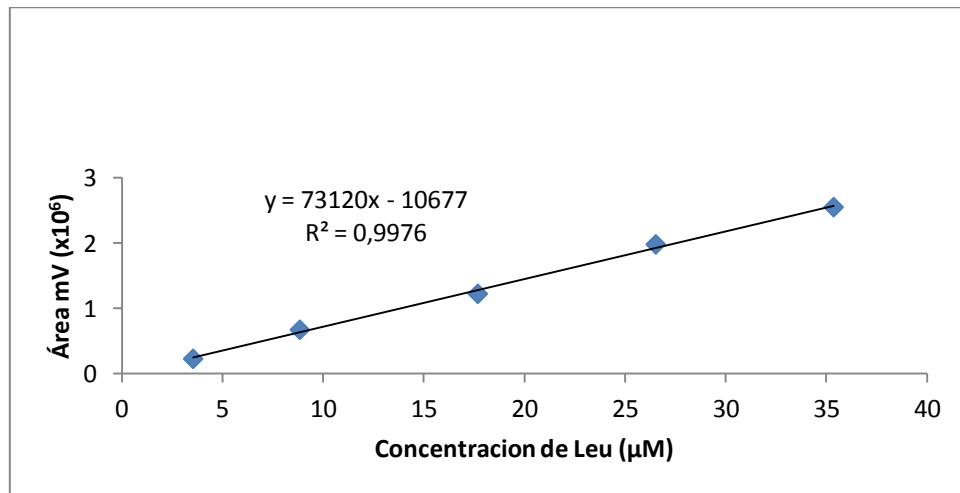


Figura 15. Curva calibración de Leucina.

V.7. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas para la separación de los aminoácidos en estudio y la determinación de la concentración de dichos analitos en orina, las muestras fueron filtradas con filtros de celulosa de 0,45 μm de poro. Para la derivatización se mezclaron 100 μL de la muestra filtrada, 350 μL de buffer de borato pH 10 y 50 μL de OPA-2MPA, se dejó reaccionar por 1min y se procedió a la inyección de 10 μL con el inyector automático.

V.8. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE LA CREATININA

V.8.1 Tratamiento de las muestras

Se utilizó el método de Jaffé ^[58] modificado que se describe a continuación:

Las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se homogenizaron por agitación. Se agregaron 5mL de una disolución de ácido pícrico (Reidel-de Haen) al 1% p/v en un balón de 25mL, luego se adicionaron 0,38 mL (380 μL) de hidróxido de sodio (Merck) 2,5 M y una alícuota de la muestra de 0,3 mL (300 μL). Se dejó la mezcla en reposo durante media hora, para garantizar que se completara la reacción, luego se llevaron a un volumen final de 25mL con agua desionizada.

V.8.2. Cuantificación de la creatinina en las muestras de orina y preparación de la curva de calibración.

Se determinó la concentración de creatinina en la orina por medio de una regresión lineal. Para la realización de la curva de calibración se preparó una solución estándar de creatinina 500mg/L a partir del estándar sólido (Riedel-de Haen). La tabla 6 muestra las concentraciones de los patrones para la curva.

Tabla 6. Patrones para la determinación de creatinina

Conc. patrón (g/mL)	Vol. NaOH (mL)	Vol. ácido pítrico (mL)	Vol. madre (μL)	Vol. Enrase (mL)
Blanco	380	5	0	25
2	380	5	100	25
5	380	5	250	25
10	380	5	500	25
20	380	5	1000	25

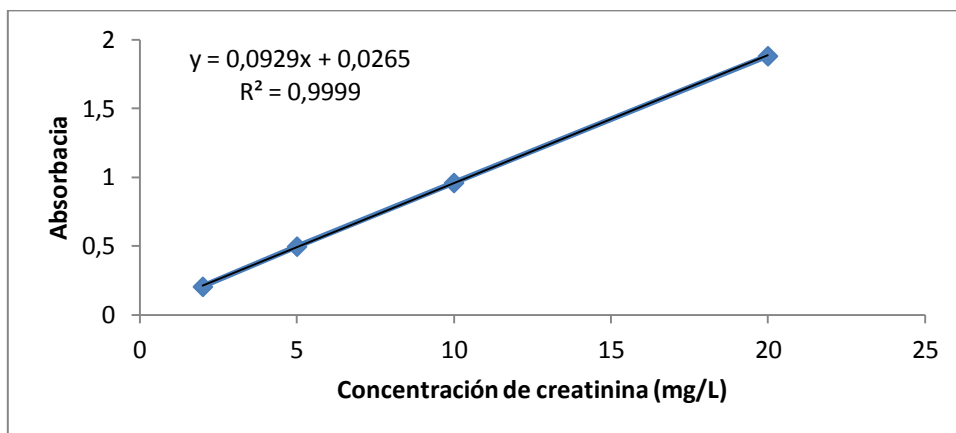


Figura 16. Representación típica de la curva de calibración para determinar creatinina

V.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la comparación de los grupos estudiados, se empleó como método de análisis estadístico el programa STATGRAPHICS (STAGRAPHICS CENTURION XVI.I) para determinar la correlación entre las variables en estudio. Este procedimiento construye diversas pruebas estadísticas y gráficos para comparar las muestras. Al trabajar con muestras biológicas, estas no demuestran distribución normal por tal motivo, se utilizó para comparar los datos de los tres grupos la prueba Kruskal-Wallis.

V.10 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA RECUPERACIÓN.

Al no contar con un material certificado para determinar la exactitud del método, se determinó el porcentaje de recuperación de cada aminoácido en la muestra de orina. Se enriqueció la muestra de orina con una concentración conocida de los patrones de aminoácidos. El cálculo de la recuperación se determinó utilizando la siguiente ecuación.

$$\%R = ((CF-CU)/CA) * 100$$

CF: concentración del analito en la muestra fortificada

CU: concentración del analito en la muestra sin fortificar

CA: concentración del analito adicionada.

CAPITULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el análisis de los aminoácidos en las muestras de orina, se inicio el estudio bajo las condiciones reportadas por Carducci ^[48], a excepción del volumen de inyección que fue modificado, ya que el autoinyector presentaba baja reproducibilidad con volúmenes inferiores a los 10 μL . Con las condiciones inicialmente utilizadas ^[48] se observó baja resolución en la separación cromatográfica de los aminoácidos. Luego de ser modificado el flujo y el programa de elución a las condiciones mostradas en la tabla 4, la correspondiente separación de los picos de los aminoácidos se realizó con excelente resolución, como se puede visualizar en la figura 18. La resolución de los picos se avaluó a partir del valor de resolución (R_s) de los picos adyacentes, obteniéndose un valor de R_s mayor que 1,5 para los aminoácidos, lo que indica que los picos están bien separados. El valor de asimetría (A_s) calculado para los picos fue mayor a 9,7 lo que indica que los picos son simétricos.

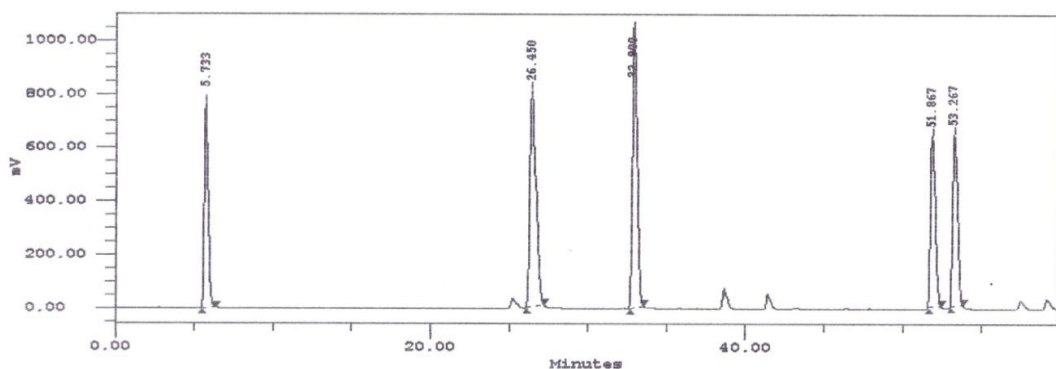


Figura 17. Cromatograma de a los aminoácidos en estudio.

Las condiciones seleccionadas para la separación de los aminoácidos en orina se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas seleccionadas para el análisis de aminoácidos Ácido aspártico, Serina, Arginina, Isoleucina y Leucina.

Tiempo (min)	S _A /S _B (%)	Flujo (mL/min)	V _{inyección} (μL)	T °C	λ _{em} λ _{ex} (nm)
0	90/10	1,5	10	40	344 450
15	90/10				
55	55/45				

VI. 1. IDENTIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

La identificación de los picos de los aminoácidos Ácido aspártico, Serina, Arginina, Isoleucina y Leucina en la orina se realizó comparando el área, altura y tiempo de retención de una muestra y la misma muestra enriquecida con los de aminoácidos en estudio. En la figura 19 se muestran los cromatogramas correspondientes a: A) muestra no enriquecida y B) muestra enriquecida. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8.

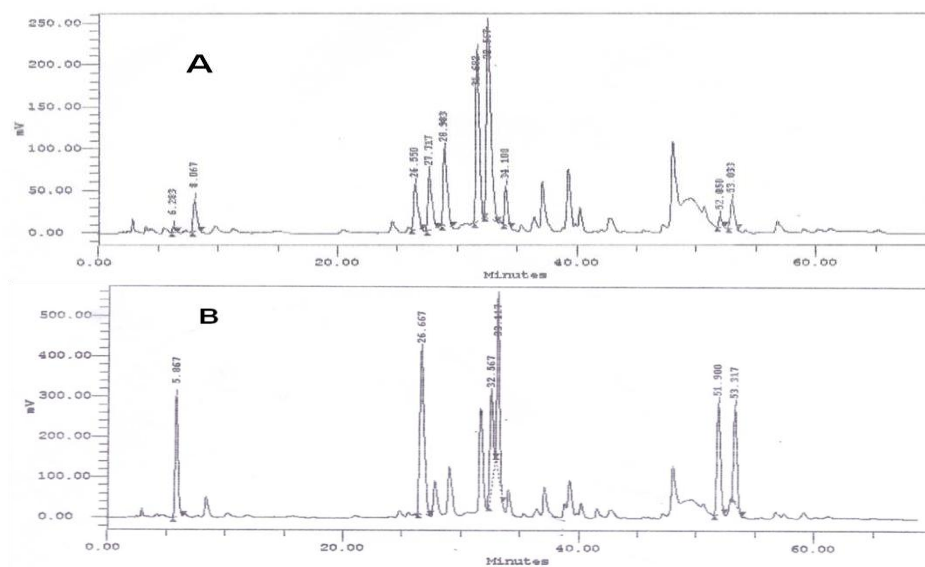


Figura 18. (A) Cromatograma de la muestra no enriquecida. (B) Cromatograma de la muestra enriquecida.

Tabla 8. Identificación de los picos de los aminoácidos.

Muestra	Picos	T _R (min)	Área (uV*Sec)	Altura (uV)
No Enriquecida	1	5,983	140456	6949
	2	26,833	1341234	55784
	3	*	*	*
	4	52,000	233008	12884
	5	53,000	953015	38858
Enriquecida	1	5,867	4913937	303577
	2	26,667	10175752	406206
	3	33,117	7061667	428844
	4	51,900	5668551	276987
	5	53,317	4696438	242799

*no se encontró el pico en la muestra analizada

VI.2. FIGURAS DE MÉRITO

VI.2.1 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección y de cuantificación se determinó a partir del método señalado en el Miller^[59], por extrapolación de la curva de calibración de cada aminoácido. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Límite de detección y límite de cuantificación

Aminoácido	Límite de detección (LOD) (μmol/L)	Límite de cuantificación (LOQ) (μmol/L)
Ácido aspártico	0,02	0,06
Serina	3	10
Arginina	30	70
Isoleucina	0,4	4
Leucina	0,09	2

Tabla 10. Comparación de los límites de detección.

Autor	AA estudiado	Derivatizante	Técnica analítica	LOD
Carducci ^[48]	40 AA	OPA/3MP	HPLC-fluorescencia	50-500 fmol
Hernández ^[54]	Isoleucina	OPA/2ME	HPLC-UV	9,5 μmol/L
Montes ^[56]	Isoleucina	OPA/2ME	HPLC-UV	17 μmol/L

Los límite de detección del método propuesto para los aminoácidos, están por encima de los reportado por Carducci^[48] en su trabajo, su mayor sensibilidad está asociada al empleo de un tiol (3-mercaptopropanoico) en el proceso de derivatización, el cual le confiere mayor estabilidad al isoindol fluorescente, lo cual lo convierte en un derivado más sensible^[47]. Por su parte el LOD obtenido para la isoleucina en este estudio (0,4 $\mu\text{mol/L}$), fue inferior al obtenido por Hernández ^[54] y Montes ^[56] en sus trabajos, ambas en su técnica de análisis emplearon un detector UV-Visible que posee menor sensibilidad que el detector de fluorescencia ^[37]

VI.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La exactitud del método se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de cada aminoácidos en la muestra de orina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11. Se puede observar que los porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los límites para las muestras biológicas, cuyos valores oscilan entre 80 y 120% ^[60], por lo tanto el método presenta una exactitud aceptable para estos aminoácidos.

Tabla 11. Porcentaje (%) de recuperación de los aminoácidos en la orina.

Aminoácido	[$\mu\text{mol/L}$] _{muestra}	[$\mu\text{mol/L}$] _{patrón} agregado	[$\mu\text{mol/L}$] _{encontrados}	%recuperación
Ácido aspártico	1108	524	1580	90
Serina	2954	235	4860	87
Arginina	*	402	*	*
Isoleucina	1498	727	2080	80
Leucina	1539	435	1909	85

*el pico correspondiente a la Arginina no se observó en la muestra ensayada.

La precisión del método se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa %RSD de los tiempos de retención y áreas de los picos de los aminoácidos en una muestra de orina (ver tabla 12). Para evaluar la %RSD de los aminoácidos en la muestra, se realizaron tres corridas consecutivas.

Tabla 12. % RSD de los tiempos de retención, áreas y concentraciones.

Aminoácidos	Promedio $\pm$ S *			% RSD		
	t _R (min)	Área (uV)	Conc ($\mu\text{mol/L}$)	t _R (min)	Área (uV)	Conc ($\mu\text{mol/L}$)
Asp	5,85 $\pm$ 0,02	242048 $\pm$ 247	15,51 $\pm$ 0,02	0,3	0,1	0,1
Ser	26,4 $\pm$ 0,1	10911822 $\pm$ 15239	717 $\pm$ 1	0,4	0,1	0,1
Arg	**			**		
Ile	52,02 $\pm$ 0,05	2344233 $\pm$ 4861	150,6 $\pm$ 0,3	0,1	0,2	0,2
Leu	53,06 $\pm$ 0,07	1635821 $\pm$ 30655	112 $\pm$ 2	0,1	2	0,02

*promedio de los tiempos de retención, áreas y concentración más o menos la desviación estándar correspondiente para cada aminoácido estudiado en la orina.

**el pico correspondiente a la Arginina se resolvió en el cromatograma de la muestra.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión del método analítico planteado en la muestra de orina, se puede decir que los %RSD de los tiempos de retención, áreas y concentraciones de los picos de todos los aminoácidos son aceptables por ser menor que 5% ^[37].

VI.3. DETERMINACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

Una vez seleccionadas las condiciones para la determinación de los aminoácidos Asp, Ser, Arg, Iso y Leu presentadas en la tabla 6, se procedió a realizar el análisis de las muestras de orina de los grupos de individuos en estudio. En la tabla 13 se muestran los resultados de las curvas de calibración correspondiente para cada aminoácido, el rango lineal en el cual se trabajó, al igual que las desviaciones estándar correspondiente a la curva y su coeficiente de correlación. La selección del intervalo de concentración estudiado para cada aminoácido correspondió al promedio general de los analitos en la muestra.

Tabla 13. Intervalos de concentración ($\mu\text{mol/L}$) de los estándares de los aminoácidos, pendiente, intercepto, coeficiente de correlación y error estándar de la pendiente y del intercepto, para la determinación aminoácidos en orina.

Aminoácido	Intervalo de concentración ($\mu\text{mol/L}$)	M	sm*	B	sb**	R
Asp	1,56 - 4,79	80118	188	-6474	535	0,9989
Ser	8,25 – 200,94	76155	474	-23696	37119	0,9999
Arg	62,45–312,28	67849	3685	1×10^6	719424	0,9991
Ile	3,22 – 80,40	77059	1652	23223	46413	0,9976
Leu	3,54 – 35,37	73120	2062	-10677	37664	0,9942

m=pendiente de la curva, sm*=error estándar de la pendiente, b=intercepto de la curva, sb**=error estándar del intercepto, r=coeficiente de correlación.

Se analizaron veinticuatro (24) muestras de orina de individuos de diferentes edades con patologías en la próstata y sujetos sanos, diez (10) muestras de individuos sanos, ocho (8) de pacientes con cáncer y seis (6) con hiperplasia. Algunos de los cromatogramas de las muestras analizadas se presentan en los apéndices. Se realizó una corrida cromatográfica para cada muestra.

En las tablas 14, 15 y 16, se muestran los resultados de las concentraciones para los sujetos sanos, pacientes con hiperplasia y pacientes con cáncer de próstata respectivamente. Igualmente se muestran las concentraciones de los aminoácidos normalizadas por la excreción de creatinina en la orina de los individuos estudiados.

Tabla 14. Concentración de los aminoácidos en orina de sujetos sanos.

Muestra	Aminoácido	Área (uV)	Concentración (μmol/L)	Creatinina (g/L)	mgAA/gcreat
1	Asp	422519	26±9	1,205±0,02	5,16±0,8
	Ser	4960845	70±3		2,62±0,2
	Arg	*	*		*
	Ile	754707	47±2		5,16±0,7
	Leu	341920	24±1		2,6±0,2
2	Asp	32554	2,43±0,8	2,4±0,1	0,13±0,03
	Ser	921218	62,0±0,6		2,71±0,3
	Arg	*	*		*
	Ile	1704597	109±5		5,96±0,2
	Leu	1491003	102±4		5,6±0,4
5	Asp	<LD	<LD	1,12±0,03	-
	Ser	2054726	136±1		12,7±0,8
	Arg	*	*		*
	Ile	566867	35±1		4,1±0,4
	Leu	702611	48±2		5,6±0,5
6	Asp	296069	18±7	2,3±0,1	1,1±0,1
	Ser	126724	9,8±0,1		0,45±0,02
	Arg	*	*		*
	Ile	2085835	133±5		7,7±0,5
	Leu	1554003	106±5		6,1±0,6

Continuación tabla 14. Concentración de los aminoácidos de orina en sujetos sanos.

Muestra	Aminoácido	Área (uV)	Concentración (μmol/L)	Creatinina (g/L)	mgAA/gcret
7	Asp	<LD	<LD	1,376±0,03	-
	Ser	617003	42,1±0,4		3,21±0,05
	Arg	*	*		*
	Ile	1540082	98±3		9,4±0,3
	Leu	1752021	120±6		11,5±0,5
8	Asp	468200	29±5	1,62±0,07	2,4±0,2
	Ser	5869259	386±4		25,0±0,6
	Arg	*	*		*
	Ile	1255397	79±3		6,4±0,4
	Leu	619789	43±2		3,4±0,3
9	Asp	270408	17,27±2	1,09±0,02	2,1±0,2
	Ser	3408748	225±2		21,6±0,2
	Arg	*	*		*
	Ile	747653	47±2		5,6±0,3
	Leu	373748	26±1		3,1±0,1
10	Asp	<LD	<LD	0,715±0,008	-
	Ser	3408748	13,5±0,1		1,98±0,01
	Arg	*	*		*
	Ile	34863	0,75±0,02		0,183±0,003
	Leu	395530	27,77±2		5,102±0,2

Continuación tabla 14. Concentración de los aminoácidos de orina en sujetos sanos.

Muestra	Aminoácido	Área (uV)	Concentración (μ mol/L)	Creatinina (g/L)	mgAA/mgcreat
31	Asp	100522	25 $\pm$ 1	1,06 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,1
	Ser	1995201	132 $\pm$ 1		13,0 $\pm$ 0,1
	Arg	*	*		*
	Ile	425604	26,1 $\pm$ 0,8		3,2 $\pm$ 0,1
	Leu	359933	25,3 $\pm$ 0,8		3,1 $\pm$ 0,1
40	Asp	<LD	<LD	2,203 $\pm$ 0,01	-
	Ser	7712414	507 $\pm$ 5		24,2 $\pm$ 0,6
	Arg	*	*		*
	Ile	1747435	111,87 $\pm$ 4		6,6 $\pm$ 0,5
	Leu	1032104	71 $\pm$ 4		4,24 $\pm$ 0,5

Tabla 15. Concentración de los aminoácidos en orina de pacientes con hiperplasia.

Muestra	Aminoácido	Área (uV)	Concentración (μmol/L)	Creatinina (g/L)	mgAA/gcreat
11	Asp	66919	4,576±1	2,6±0,1	0,2±0,1
	Ser	530851	36,4±0,3		1,47±0,04
	Arg	*	*		*
	Ile	1133839	72,06±2		3,6±0,2
	Leu	180120	13,04±0,6		0,66±0,07
12	Asp	172226	11±3	1,54±0,07	0,96±0,4
	Ser	530851	85,5±0,8		5,84±0,1
	Arg	*	*		*
	Ile	1364503	87±3		7,42±0,3
	Leu	1001825	69±3		5,90±0,4
15	Asp	-	<LD	5,79±0,8	-
	Ser	3661496	241±2		4,39±0,26
	Arg	*	*		*
	Ile	1458436	93±4		2,11±0,5
	Leu	1155706	79±3		1,8±0,4
16	Asp	27660	2,1±0,7	2,9±0,01	0,11±0,09
	Ser	665974	45,2±0,4		1,84±0,05
	Arg	*	*		*
	Ile	956602	60±2		3,07±0,2
	Leu	1570264	108±5		5,47±0,6

Continuación Tabla 15. Concentración de los aminoácidos en orina de pacientes con hiperplasia.

Muestra	Aminoácido	Área (uV)	Concentración (μmol/L)	Creatinina (g/L)	mgAA/gcreat
17	Asp	<LD	<LD	1,52±0,07	-
	Ser	5815169	38,7±0,4		26,73±0,05
	Arg	*	*		*
	Ile	1241884	79±3		6,90±0,4
	Leu	1326940	17,76±0,9		7,96±0,1
22	Asp	297937	18±2	1,26±0,06	1,97±0,3
	Ser	1251912	83±4		6,86±0,5
	Arg	*	*		*
	Ile	753192	47±2		4,84±0,3
	Leu	249160	17,7±0,9		1,86±0,1

Tabla 16. Concentración de los aminoácidos en orina de pacientes con cáncer de próstata.

Muestra	Aminoácido	Área (uV)	Concentración (μmol/L)	Creatinina (g/L)	mgAA/gcrat
14	Asp	<LD	<LD	1,92±0,08	-
	Ser	4359995	287±3		15,4±0,3
	Arg	*	*		*
	Ile	1139569	72±2		4,8±0,3
	Leu	1274032	17,5±0,9		1,2±0,1
18	Asp	230340	14±1	1,94±0,08	1,0±0,1
	Ser	6111565	402±4		22,0±0,5
	Arg	*	*		*
	Ile	1535246	98±3		6,7±0,4
	Leu	627486	43,2±0,4		0,59±0,1
19	Asp	<LD	<LD	1,76±0,08	-
	Ser	5660955	373±4		23,01±0,5
	Arg	*	*		*
	Ile	782937	49±1		3,79±0,1
	Leu	1033384	71,3±0,7		1,10±0,09
23	Asp	<LD	<LD	0,94±0,01	-
	Ser	342063	203,2±0,2		2,68±0,03
	Arg	*	*		*
	Ile	<LD	<LD		-
	Leu	524696	36,6±0,4		1,02±0,05

Continuación Tabla 16. Concentración de los aminoácidos en orina de pacientes con cáncer de próstata.

Muestra	Aminoácido	Área (uV)	Concentración (μmol/L)	Creatinina (g/L)	mgAA/gcreat
54	Asp	241873	15±2	SM	-
	Ser	10922598	718,7±0,2		-
	Arg	*	*		-
	Ile	2347671	150,82±4		-
	Leu	1614145	111,1±0,4		-
69	Asp	796624	50±8	SM	-
	Ser	796624	53±7		-
	Arg	*	*		-
	Ile	<LD	<LD		-
	Leu	53568	0,87±0,04		-
78	Asp	<LD	<LD	SM	-
	Ser	1086807	72,9±0,5		-
	Arg	*	*		-
	Ile	435822	26,7±0,8		-
	Leu	205778	14,8±0,7		-
80	Asp	<LD	<LD	SM	-
	Ser	<LD	<LD		-
	Arg	*	*		-
	Ile	<LD	<LD		-
	Leu	385862	27,1±0,2		-

SM: sin medición. Muestra que expiro su tiempo para determinar la creatinina

El análisis de los resultados de las muestras de orina se realizó comparando los tres grupos en estudio (sanos, hiperplasia y cáncer) en función de cada aminoácido determinado, las concentraciones obtenidas fueron igualmente normalizadas por la concentración de creatinina excretada en la orina. Cuando se trata de muestras de orina PUNTUAL para el monitoreo biológico de la exposición ocupacional son generalmente normalizada sobre la base de la concentración de creatinina (CR), para tomar en cuenta las fluctuaciones en dilución de la orina ^[61].

Se compararon las medianas de las concentraciones de cada aminoácido, utilizando diagramas de cajas y bigotes, los cuales describen al mismo tiempo varias características importantes de los resultados, como son la mediana, la dispersión, el alejamiento de la simetría, y la identificación de puntos atípicos. Las siguientes figuras muestran los resultados de estos análisis.

Ácido aspártico

En el gráfico de cajas y bigotes que se presenta en la figura 20 se muestra la distribución de las concentraciones de ácido aspártico sin normalizar en los tres grupos, en este caso en particular, no se pudo comparar estos resultados con las concentraciones normalizadas, ya que a las muestras que se le determinó este aminoácido, al momento de ser analizadas había expirado el tiempo que recomienda la literatura^[54] para determinar la concentración de creatinina. En la gráfica se observa que las cajas son bastante anchas, indicando una gran dispersión de los valores de las concentraciones de ácido aspártico en los tres grupos. Con la aplicación de la prueba estadística Kruskal-Wallis, dando como resultado un valor de P igual 0,4 lo cual demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres

grupos estudiados para el 95% de confianza. MacGregor^[45] reportó que la excreción de este aminoácido no presenta diferencias significativas entre los pacientes con cáncer y los sanos. Consideramos que habría que analizar mayor número de muestras para poder llegar a conclusiones.

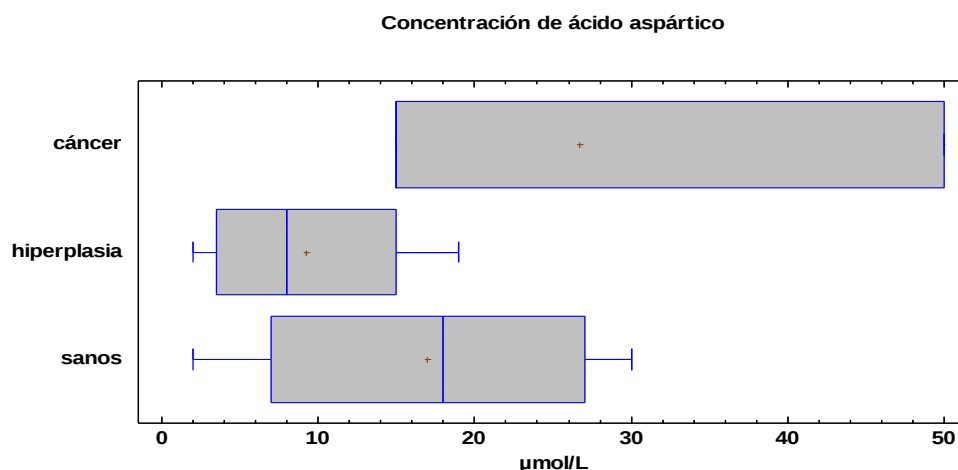


Figura 19. Representación gráfica de las medianas de los valores de ácido aspártico en las muestras de orina de los tres grupos estudiados.

Serina

En las figuras 21 y 22, se presentan las gráficas obtenidas para la distribución de los valores de serina sin normalizar y normalizadas respectivamente, en ambos de presentar los resultados, se obtienen los mismos resultados tanto gráficamente, como para la prueba estadística no paramétrica presentada en la tabla 17. En ambos casos el valor de P es mayor que 0,05 indicando que no existe diferencias estadísticamente significativas para los tres grupos en lo que se refiere a la excreción de este aminoácidos en la orina. Por su parte McGregor^[45] en su investigación concluye que la

excreción de este aminoácido en particular no presentó diferencias significativas entre los pacientes sanos y pacientes con cáncer, Concordando así con los resultados obtenidos en el estudio. Los resultados para el aminoácido serina en este estudio evidencian, que la excreción de este aminoácido no presenta diferencias estadísticamente significativas entre sujetos sanos, pacientes con cáncer próstata e hiperplasia.

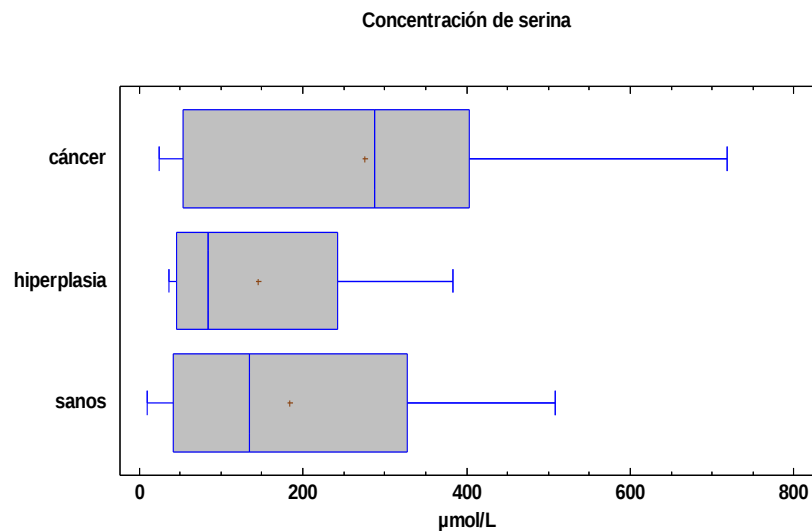


Figura 20. Representación gráfica de los valores de serina en las muestras de orina de los tres grupos en estudio.

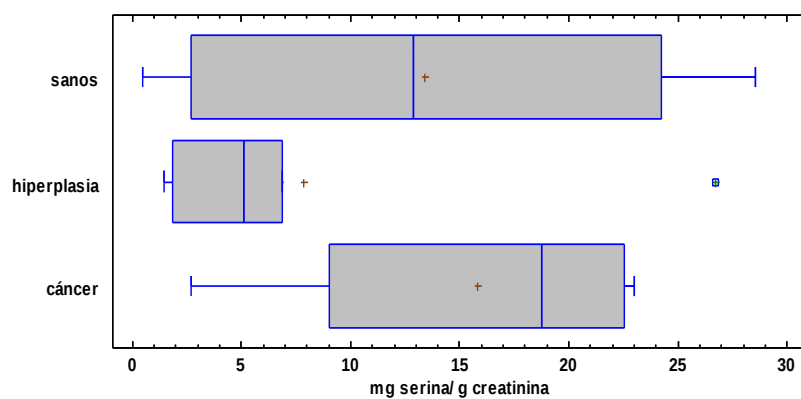


Figura 21. Representación gráfica de los valores de las concentraciones de serina normalizados con la creatinina en las muestras de orina de los tres grupos en estudio.

Tabla 17. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para la serina.

Concentración de serina	Grupo de estudio	Tamaño de muestra	Promedio	Valor de P
Sin normalizar	Sanos	10	13,8	0,7
	Hiperplasia	6	10,8	
	Cáncer	7	11,4	
Normalizadas	Sanos	10	11,0	0,6
	Hiperplasia	6	8,5	
	Cáncer	4	12,25	

Leucina

En las figuras 23 y 24 se muestra la distribución de los valores de concentración de leucina sin normalizar y normalizada respectivamente, comparando las dos figuras podemos observar que las cajas se hacen más estrechas al normalizar el valor de la concentración con respecto al valor de la creatinina, es decir, se obtiene mayor homogeneidad de los resultados. En este caso se puede observar una diferencia entre el grupo de cáncer con respecto a las de hiperplasia y sanos. Al realizar la prueba estadística Kruskal-Wallis, presentados en la tabla 18 se obtienen como resultados valores de P de 0,002 y 0,02 para valores sin normalizar y normalizados respectivamente los cuales son menores que 0,05, por lo tanto hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos estudiados.

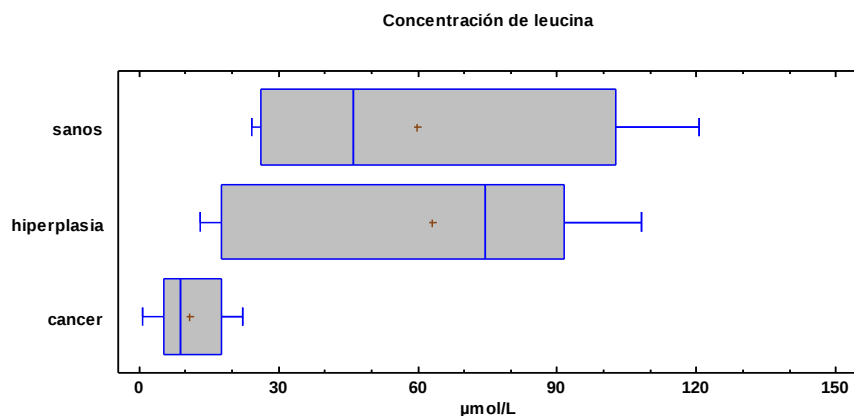


Figura 22. Representación gráfica de los valores de concentración de leucina en las muestras de orina de los tres grupos en estudio.

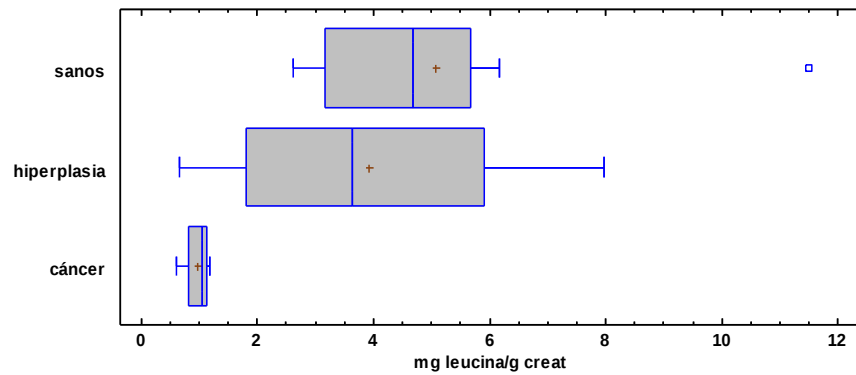


Figura 23. Representación gráfica de los valores de leucina normalizada con la creatinina en las muestras de orina de los tres grupos.

Tabla 18. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para la leucina.

Concentración de leucina	Grupo de estudio	Tamaño de muestra	Promedio	Valor de P
Sin normalizar	Sanos	10	12,5	0,002
	Hiperplasia	6	11,0	
	Cáncer	4	2,8	
Normalizada	Sanos	10	13,2	0,02
	Hiperplasia	6	10,8	
	Cáncer	4	3,25	

Con el objeto de determinar cuál de los grupos es diferente a los otros, se realizó el estudio de la varianza de los tres grupos, para de esta manera, poder relacionarlos entre sí. Los resultados se muestran en la tabla 19, los valores obtenidos de P 0,0030 y 0,0022 obtenidos para la relación sanos/cáncer e hiperplasia/cáncer respectivamente, son menores que 0,05 por lo tanto el grupo de cáncer de próstata es estadísticamente diferente a los grupos de individuos sanos y al de los pacientes con hiperplasia.

Tabla 19. Verificación de Varianza para las concentraciones de leucina normalizadas.

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
sanos / hiperplasia	2,5758	2,90539	0,785986	0,7086
sanos / cáncer	2,5758	0,25901	98,8936	0,0030
hiperplasia / cáncer	2,90539	0,259017	125,821	0,0022

Estos resultados demuestran que para la leucina, se puede inferir que el aminoácido leucina es excretado en menor concentración por el grupo de cáncer, que por el grupo de individuos sanos y el grupo de hiperplasia, en contradicción a lo reportando por McGregor ^[45], donde reporta que este aminoácido no presenta diferencias estadísticas significativas entre los sujetos sanos y los pacientes con cáncer de próstata.

La leucina fue excreta por el 100% de los individuos de cada grupo en concentraciones por encima del límite de detección (LOD 0,09 $\mu\text{mol/L}$), los rangos en la concentración variaron de acuerdo con el grupo estudiado, como se observa en la tabla 20 el rango de concentración es inferior para los individuos con cáncer.

Tabla 20. Rango de valores de leucina ($\mu\text{mol/L}$) en los tres grupos estudiados.

	Cáncer		Hiperplasia		Sanos	
	Rango	%Ind	Rango	%Ind	Rango	%Ind
Leucina	0,8-22	100	13-108	100	24-120	100

Ind=individuos

Isoleucina

Las figuras 25 y 26, representan gráficamente la distribución de las concentraciones de isoleucina sin normalizar y normalizadas respectivamente, en ellas se observa que los valores de las medianas se encuentran muy cercanos; en la tabla 21 se presentan los parámetros estadísticos de la prueba no paramétrica. Los valores de P obtenidos 0,7 y 0.9 para valores sin normalizar y normalizados respectivamente están por encima de 0,05, por lo tanto no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos para la excreción de isoleucina en la orina.

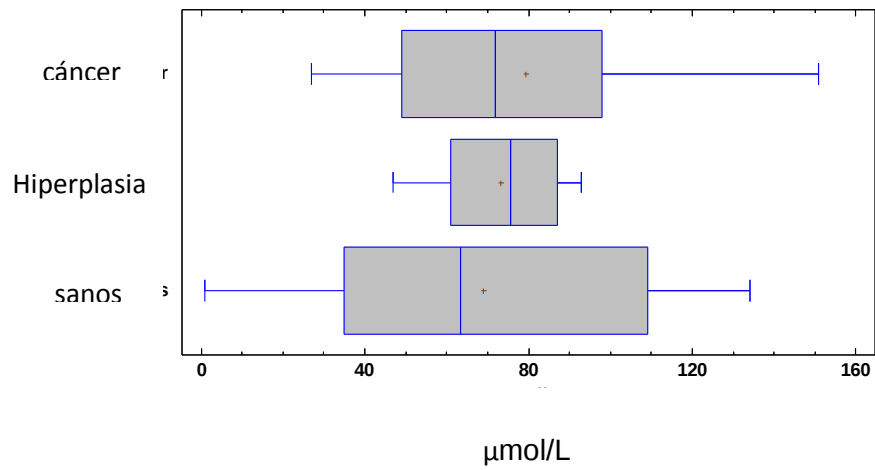


Figura 24. Representación gráfica de los valores concentración de isoleucina en las muestras de orina de los tres grupos.

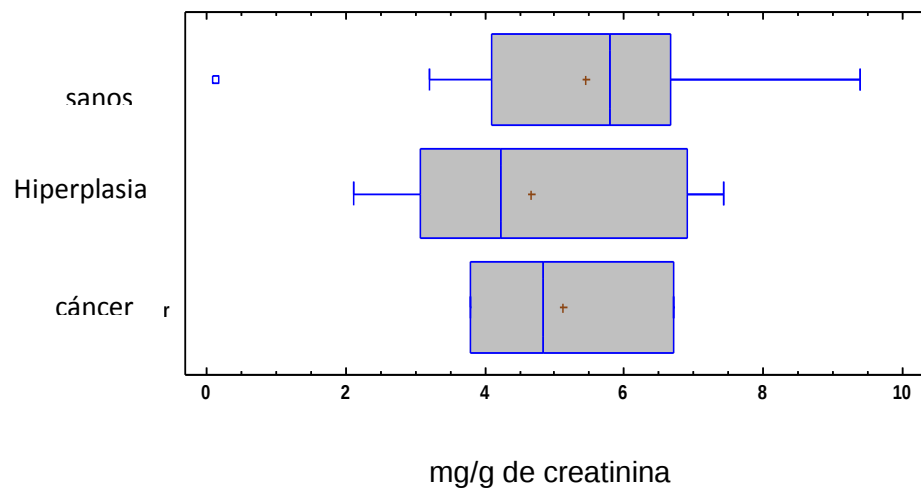


Figura 25. Representación gráfica de los valores de concentración de isoleucina normalizada por la creatinina en las muestras de orina de los tres grupos.

Tabla 21. Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para la isoleucina.

Concentración de isoleucina	Grupo de estudio	Tamaño de muestra	Promedio	Valor de P
Sin normalizar	Sanos	10	10	0,7
	Hiperplasia	6	11,0	
	Cáncer	3	11,8	
Normalizada	Sanos	10	10,1	0,9
	Hiperplasia	6	8,5	
	Cáncer	3	10,0	

McGregor^[45], Hernández^[54] y Montes^[56] encuentran mayores concentraciones de isoleucina en la orina de los pacientes con cáncer respecto a los sujetos sanos.

CONCLUSIONES

- ❖ La determinación de los aminoácidos en orina por cromatografía de líquidos (HPLC) con detección por fluorescencia, se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 80-90%
- ❖ Los límites de detección de los aminoácidos ácido aspártico, serina, arginina, isoleucina y leucina fueron: 0,02, 3, 30, 0,4 y 0,09 $\mu\text{mol/L}$ y los límites de cuantificación 0,06, 10, 70, 4, y 2 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente.
- ❖ No se encontró diferencias estadísticamente significativas en la concentración de los aminoácidos: ácido aspártico, serina e isoleucina en sujetos sanos, pacientes con hiperplasia y pacientes con cáncer de próstata.
- ❖ La concentración de leucina en orina presentó diferencias estadísticamente significativas para el grupo de cáncer de próstata en relación con el grupo de los individuos sanos y pacientes con hiperplasia.
- ❖ La concentración de leucina en orina es mucho menor en el grupo de pacientes con cáncer con relación del grupo de sujetos sano y los pacientes con hiperplasia.
- ❖ No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de sujetos sanos y el grupo de pacientes con hiperplasia para ningún aminoácido estudiado.

RECOMENDACIONES

- ❖ Profundizar el estudio con un número mayor de muestras, a fin de precisar si en realidad la concentración de estos aminoácidos en la orina se modifica por la presencia de cáncer de próstata en el hombre.
- ❖ Realizar la determinación de leucina en orina en un mayor número de pacientes con cáncer de próstata.

Glosario

Adenocarcinomas: es un [carcinoma](#) que tiene su origen en [células](#) que constituyen el revestimiento interno de las [glándulas de secreción externa](#).

Antígeno prostático específico: Prostetic Specific Antigen PSA por sus siglas en ingles. Es una sustancia proteica sintetizada por las células de la próstata. El PSA que pasa a la sangre se mide para el diagnostico, pronóstico y seguimiento del cáncer de próstata.

Benigno: no reviste de gravedad alguna, no es mortal.

Biopsia: extracción de una muestra de tejido para su examen, y así determinar si existe alguna enfermedad.

Biopsia transrectal: procedimiento en el que se extrae una muestra de tejido de la próstata usando una aguja delgada que se inserta en la próstata por el recto.

Citomegalovirus: es una forma de [herpesvirus](#); en humanos es conocido como Human herpesvirus 5 (HHV-5). Pertenece a la subfamilia [Betaherpesvirinae](#) de la familia [Herpesviridae](#). Su nombre alude al aumento de tamaño que se observa en las células infectadas producto del debilitamiento del citoesqueleto.

Ecografía transrectal: procedimiento en el cual una sonda que emite ondas sonoras de alta energía se inserta en el recto, con la finalidad de buscar anomalías en el recto y próstata.

Gleason: La escala de Gleason es un sistema que se emplea para medir el grado de agresividad de un [cáncer](#), basándose en la observación al microscopio de las características que presentan las células de la muestra obtenida en una [biopsia](#) del [tejido](#).

Hiperplasia: Es el aumento en la producción de células en un órgano o tejido normal. Puede ser un signo de cambios anormales o precancerosos, lo cual se denomina hiperplasia patológica.

Hormonas: son sustancias secretadas por [células](#) especializadas, localizadas en [glándulas de secreción interna](#) o [glándulas](#) endócrinas (carentes de conductos), o también por [células epiteliales](#) e intersticiales cuyo fin es el de influir en la función de otras células.

Metástasis: es el proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició. Ocurre generalmente por vía sanguínea o [linfática](#).

Morbilidad: es la proporción de personas que se enferman en un sitio y tiempo determinado. Minoritariamente también se usa como sinónimo morbilidad, que etimológicamente es correcto.

Semiología clínica: es el cuerpo de conocimientos que se ocupa de la identificación de las diversas manifestaciones patológicas ([síntomas](#) y [signo](#)) o datos, de cómo buscarlos (semiotecnía), como reunirlos en [síndromes](#) y cómo interpretarlos (clínica semiológica o propedéutica).

Xenobiótico: La palabra xenobiótico deriva del griego *xeno* ('extraño') y *bio* ('vida'). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el ser humano en el laboratorio. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 100 años.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cuidados Enfermeros al Paciente Oncológico. Editorial Vértice. España 2008. Tema 1. Pág. 2-3
- [2] Dos Santos Silva, Isabel. Epidemiología del Cáncer: Principios y Métodos. Agencia Internacional de Investigación Sobre el Cáncer. Cap. 1. Pág. 1.
- [3]<http://medicinalindavista.blogspot.com/2012/10/cancer.html> (IMAGEN descarga Abril 2013).
- [4]<http://gmein.uib.es/registro/informacion/pacientes/informacion111.htm> (IMAGEN descarga Abril 2013).
- [5] Anuario de Mortalidad 2010. Ministerio del Poder Popular Para la Salud. Septiembre 2012. (descarga Junio 2013)
- [6] Capote N, Luis. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. Rev. Venez. Oncol. 2006; 18:269-281
- [7] Partin. Urología. Editorial médica panamericana. 9^{na} edición. Argentina 2005. Pág. 2862.
- [8] Aller M., Arias J. Enfermería médico-quirúrgica II. Editorial Taber. Pág. 506.
- [9]http://urologialomasverdes.mex.tl/59497_Crecimiento-benigno-de-la-prosta.html (IMAGEN descarga Mayo 2013)
- [10] Sang, M; Destefano, V; Astigueta, Juan. Cáncer de Próstata en Latinoamerica. 2009; 33:1057-61

[11] Castellanos H., Cruz VP., Navarro JC., Vázquez CL., Figueroa M. Frecuencia de Complicaciones de la Biopsia Transrectal de Próstata Ecodirigida. Revist Mexico Urology 2011; 71:81-6

[12] Oletta J. Cáncer como problema de salud situación del programa nacional de lucha contra el cáncer. Informe 1. Abril 2012.

[13] Kelley. Medicina Interna. Editorial Médica Panamericana. 2^{da} edición. Argentina 1992. Pág.1265

[14] Fitzpatrick JM., Banu E., Oudard S. Prostate-specific antigen kinetics in localized and advanced prostate cancer. British Journal of Urology. 2009. 103(5):578-87

[15] Schroder F., Raaijmakers R., Postma R., Van der Kwast T., Roobol MJ. 4-year prostate specific antigen progression and diagnosis of prostate cancer in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, section Rotterdam. Journal Urology 2005; 174:489–94.

[16] Bracha Ceferino., Ramos Frontia. Semiología quirúrgica: antología de experiencias. Pág. 222

[17] Lujan M., Páez A., Fernández I. Efectos adversos de la biopsia prostática transrectal. Actas urology. España 2001; 25(11):46-49

[18] Taguchi Yosh. La próstata. Editorial Amat. 2^{da} edición. Barcelona 2006. Pág. 25, 133.

[19] <http://es.wikipedia.org/wiki/Pr%C3%B3stata> (descarga junio 2013)

[20] Rodríguez M., Baluja I. Bermudez S. Patologías benignas de la próstata: prostatitis e hiperplasia benigna. Revista Biomédica. Cuba 2007; 18:47-49

[21]<https://www.google.co.ve/search?+glandula+de+prostata> (IMAGEN descarga Abril 2013)

[22]<http://escuela.med.puc.cl/publ/anatomiapatologica/05genitalmasc/5prostata.html> (descarga Abril 2013)

[23] Gil F. El papel de los biomarcadores en toxicología humana. Departamento de Medicina Legal y Toxicología. Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

[24] Silbergeld E., Davis D. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. Clinica Chemical 1994; 40:1363-1367.

[25] De La Vega, H., Carrillo F. El estado actual y futuro de los biomarcadores moleculares en el cáncer. Gamo 2010; 09:239-41

[26]http://www.oncologica.es/index.php?option=com_content&view=article&id=16&Itemid=18 (descarga Mayo 2013)

[27] Rerd M., Yasko J. El papel de los biomarcadores en los ensayos clínico sobre el cáncer. Seminars in Oncology Nursing Mayo 2012; 28:2

[28] Bohinski, R. *Bioquímica*. Addison-wesley Iberoamericana, 1991.

[29]<https://cienciaaldia.wordpress.com/2009/04/24/destruye-aminoacidos/>(IMAGEN descargada octubre 2014)

[30] Estivalles P. Análisis de un proceso de ultrafiltración extractiva de aminoácidos utilizando contadores de fibras huecas. Tesis para optar al título de Dr. en Química. Universidad de Burgos. 2007

[31] García P, Rodríguez M, Díaz C, Egidio De Los Ríos J. Nefrología Clínica. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Pág. 138.

[32]http://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_04.htm (IMAGEN descarga Junio 2013)

[33] <http://www.es.wikipedia.org/wiki/creatinina/> IMAGEN descargada octubre 2014)

[34] Matos Manual. “Determinación de los niveles de mercurio orina en los niños de la población del Callao, estado Bolívar, Venezuela”. Trabajo de grado para optar al título de licenciado en química. 2010. Facultad de ciencias. Universidad Central de Venezuela.

[35]http://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_04.htm (IMAGEN descarga Junio 2013)

[36] <http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa> (descarga en junio)

[37] Skoog D. Holler F. Nieman T. Principios de análisis instrumental. Editorial: Mc Graw. 5^{ta} edición. España 2001.

[38]http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf (descarga octubre 2013)

[39] Méndez Alfonso. Desarrollo de Métodos Para el Aislamiento y la Detección de Toxinas en Productos de la Pesca y la Agricultura. Pág. 42.

[40] Gutiérrez C., Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Boletín intexter (U.P.C) n° 122. 2002.}

[41] Lloyd R. Snyder. Joseph J. Kirkland Joseph L. Glajcl. Practical HPLC Method Development. 2nd Pag 161-170

[42] Pawliszyo J. Lord H. Handbook Of Sample Preparation.

[43] Dennis W. Hill, Frederick H. Walters, Terry D. Wilson, and James D. High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. Microchemistry Laboratory, College of Agriculture and Natural Resources U-66, The University of Connecticut 1979.

[44] Robert F. McGregor, Geoffrey M. Brittin and Mary S. Sharon. Determination Of urinary amino acids by gas chromatography. Clinica Chimica Acta 1973; 48: 65-75.

[45] Robert F, Mcgregor, Douglas E, Johnson M. Urinary amino acid patterns in cancer excretion of prostate. Urology 1976. 8:127-128

[46] Robert F. Mcgregor, Crawford, Douglas E, Johnson, Brown B, Mary S, Sharon, Johnston D. Comparison of normal individuals and patients with bladder cancer. Urology 1977. 8: 538-542.

[47] Stobaugh F, Repta A, Sternson L, Garren K. Factors affecting the estabily of fluorescent isoindoles derived from reaction of o-phthalaldehyde and hiddroxyalkylthiols with primary amines. Analytical Biochemistry 1983. 135:495-504.

- [48] Carducci C, Birarelli M, Lenzi V, Santagata G, Serafini P, Antonozzi I. Automated method for the measurement of amino acids in urine by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1996. 729: 173-180.
- [49] Van der Graaf M., Schipper R., Oosterhof G., Schalken A., Verhofstad A., Heerschap A. Proton MR spectroscopy of prostatic tissue focused on the detection of spermine, a possible biomarker of malignant behavior in prostate cancer. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2000; 10:153-159.
- [50] Tsuruta Y, Matsumoto M, Inoue H, Munemura S, Ishizu T, Yamano S, Iguchi H. Identification of N-ethylglycine in urine of cancer patients with metastatic bone disease. *Clinica Chimica* 2007. 376: 226–228.
- [51] Serkova N., Gamito E., Jones R., O'Donnell C., Brown J., Green S., Sullivan H., Hedlund T., Crawford E. The metabolites citrate, myo-inositol and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *Department of Urology, University Hospital Charité* 2008; 68:620-8
- [52] Gatti R, Gioia M. Liquid chromatographic fluorescence determination of amino acids in plasma and urine after derivatization with phenanthroline. *Biomedical Chromatography* 2013. 22:207-213.
- [53] Sreekumar A., Poisson I., Rajendiran T., Khan A., Cao Q., Yu J., Laxman B., Mehra R., Lonigro R., Li Y., Nyati M., Ahsan A., Kalyana-Sundaram S., Han B., Cao X., Byun J., Wei J., Varambally S., Beecher C., Chinnaiyan A. Metabolomic profiles delineate potential role of sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 2009; 457(7231):910-914.

[54] Hernández Maribel. “Estudio de los niveles de isoleucina en orina como un biomarcador de cáncer de próstata”. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. 2010. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

[55] F. Bianchi., S. Dugheri M. Musci., A. Bonacchi., E. Salvadori., G. Arcangeli., V. Cupelli., M. Lanciotti., L. Masieri., S. Serni., M. Carini., M. Careri., A. Mangia. Fully automated solid-phase microextraction–fast gas chromatography–mass spectrometry method using a new ionic liquid column for high-throughput analysis of sarcosine and N-ethylglycine in human urine and urinary sediments. *Analitica Chimica Acta* 2011; 707:197-203.

[56] Montes Claudia. “Estudio de los niveles de isoleucina en orina como un biomarcador de cáncer de próstata”. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado de Química. 2011. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas

[57] Shamsipur M., Taghi M., Babri M. Quantification of candidate prostate cancer metabolite biomarkers in urine using dispersive derivatization liquid–liquid microextraction followed by gas and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013; 81-81:65-75.

[58] Rodríguez N, Torres D, Carvaja M. Confiabilidad del método de Jaffé modificado por laboratorios Heiga para la determinación automatizada de la creatinina. *Revista de la Facultad De Farmacia* 2001. Vol. 42.

[59] Miller y Miller. Estadística y quimiometria para química analítica. Cuarta edición. 2002.

[60] Parkany, M. The use factors in trace analysis. The royal society of chemistry, 1996

[61] Jean-François Sauvé, Martine Lévesque, Mélanie Huard, Daniel Drolet, Jérôme Lavoué, Robert Tardif Y Ginette Truchon. Creatinine and specific gravity normalization in biological monitoring of occupational exposures. journal of occupational and environmental hygiene 2014; 37-41

APÉNDICE

Anexo 1. Equipo de HPLC utilizado.



Anexo 2. Consentimiento de información de los pacientes

ESTUDIO DE BIOMARCADORES EXCRETADOS EN LA ORINA, PARA EL DIAGNOSTICO PRECOZ DEL CANCER DE PROSTATA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA SUJETOS DE ACUERDO EN PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO CLINICO

Nombre del paciente: _____

C.I: _____

Fecha de Nacimiento: _____ Años: _____

1. Convengo voluntariamente tomar parte en este estudio, sin importar mi edad; con el consentimiento de mis padres (solo en el caso de ser menor de edad).
2. He recibido una explicación completa del propósito del estudio, de los procesos involucrados y de lo que se espera de mí.
3. Le he informado al encuestador sobre todos los medicamentos y drogas que estoy todavía tomando en la actualidad.
4. Convengo cooperar totalmente con el médico supervisor, y le informaré de inmediato si sufro cualquier síntoma inesperado o inusual.
5. Entiendo que tengo plena libertad de retirarme del estudio en cualquier momento y este retiro no afectará de alguna forma mi tratamiento o manejo médico futuro.
6. Entiendo que la información de mis registros médicos es esencial para evaluar los resultados del estudio. Convengo dar a conocer esta información con base en el entendimiento que será tratada confidencialmente.
7. Entiendo que se hará referencia de mi nombre en el informe correspondiente al estudio.
8. Recibiré información de los resultados obtenidos en los análisis.
9. Estoy informado de que para obtener información sobre mis derechos, como participante de un estudio de investigación, podré contactar al médico investigador que firma la presente o al investigador del Centro de Química Analítica de la U.C.V (Caracas), relacionado con dicho estudio.

Firma del paciente: _____

Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Anexo 3. Resultados de la biopsia prostática.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO "DR. JOSÉ ANTONIO O'DALY"
Centro Nacional de Referencia en Anatomía Patológica

Muestra: B-007274-10

Fecha de Recepción: 22/07/2010
Material: PROSTATA (12 FRASCOS)
Centro: H.U.C.
Servicio: UROLOGÍA
Médico Tratante:

RAUL SUAREZ
Cédula: 83143522
Historia:
Edad: 0 Años
Teléfono: 0212

INFORME DE BIOPSIA

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se reciben fijados en formol en envases separados, el siguiente material:

- 1.- LATERAL IZQUIERDO BASAL: Un fragmento cilíndrico de 1,9 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 2.- LATERAL IZQUIERDO MEDIAL: Un fragmento cilíndrico de 2 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 3.- LATERAL IZQUIERDO APICAL: Un fragmento cilíndrico de 2 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 4.- PARASAGITAL BASAL IZQUIERDO: Un fragmento cilíndrico, de 1,5 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 5.- PARASAGITAL MEDIAL IZQUIERDO: Un fragmento cilíndrico de 1 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 6.- PARASAGITAL IZQUIERDO APICAL: Un fragmento cilíndrico de 1,2 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 7.- LATERAL DERECHO BASAL: Un fragmento cilíndrico de 1,51 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 8.- LATERAL DERECHO MEDIAL: Un fragmento cilíndrico de 1 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 9.- LATERAL DERECHO APICAL: Un fragmento cilíndrico, de 1,6 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 10.- PARASAGITAL DERECHO BASAL: Un fragmento cilíndrico de 1,5 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 11.- PARASAGITAL MEDIAL DERECHO: Un fragmento cilíndrico de 2 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
 - 12.- PARASAGITAL DERECHO APICAL: Un fragmento cilíndrico de 1,2 x 0,1 cm, blanquecino, blando. Se incluye en su totalidad para estudio histológico. 1C/1FT
- MHP/ES/ya26/07/10

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO "DR. JOSÉ ANTONIO O'DALY"
Centro Nacional de Referencia en Anatomía Patológica

Muestra: B-007274-10

Nº5. PROSTATA PARASAGITAL IZQUIERDO (PORCION MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCION:

- ADENOCARCINOMA GLEASON 8 (4+4)
- NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1
- TAMAÑO DEL TUMOR: 1,5 mm
- PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 20%
- INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA
- INFILTRACION PERINEURAL: PRESENTE

Nº6. PROSTATA PARASAGITAL IZQUIERDO (PORCION APICAL); BIOPSIA POR PUNCION:

- ADENOCARCINOMA GLEASON 8 (4+4)
- NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1
- TAMAÑO DEL TUMOR: 5 mm
- PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 40%
- INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA
- INFILTRACION PERINEURAL: PRESENTE

Nº7. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCION BASAL); BIOPSIA POR PUNCION:

- ADENOCARCINOMA GLEASON 9 (4+5)
- NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1
- PORCENTAJE GRADO 4: 90%
- PORCENTAJE GRADO 5: 10%
- TAMAÑO DEL TUMOR: 8 mm
- PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 70%
- INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA
- INFILTRACION PERINEURAL: NO OBSERVADA

Nº8. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCION MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCION:

- ADENOCARCINOMA GLEASON 9 (4+5)
- NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1
- PORCENTAJE GRADO 4: 80%
- PORCENTAJE GRADO 5: 20%
- TAMAÑO DEL TUMOR: 6 mm
- PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 60%
- INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA
- INFILTRACION PERINEURAL: NO OBSERVADA
- GLANDULAS ATROFICAS.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO "DR. JOSÉ ANTONIO O'DALY"
Centro Nacional de Referencia en Anatomía Patológica

Muestra: B-007274-10

Nº9. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCION APICAL); BIOPSIA POR PUNCION:

- TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.
- INFILTRADO INFLAMATORIO MONONUCLEAR ESTROMAL ESCASO.

Nº10. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCION BASAL); BIOPSIA POR PUNCION:

- ADENOCARCINOMA GLEASON 9 (4+5)
- NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1
- PORCENTAJE GRADO 4: 60%
- PORCENTAJE GRADO 5: 40%
- TAMAÑO DEL TUMOR: 9 mm
- PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 80%
- INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA
- INFILTRACION PERINEURAL: NO OBSERVADA

Nº11. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCION MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCION:

- ADENOCARCINOMA GLEASON 9 (4+5)
- NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1
- PORCENTAJE GRADO 4: 60%
- PORCENTAJE GRADO 5: 40%
- TAMAÑO DEL TUMOR: 10 mm
- PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 60%
- INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA
- INFILTRACION PERINEURAL: PRESENTE.

Nº12. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCION APICAL); BIOPSIA POR PUNCION:

- ADENOCARCINOMA GLEASON 8 (4+4)
- TAMAÑO DEL TUMOR: 2 mm
- PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 20%
- INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA
- INFILTRACION PERINEURAL: NO OBSERVADA

DR. PEDRO CASTILLO DRA. PATRICIA MARTI DRA. MARIA V. DIAZ
zd12/08/10

Anexo 4. Modelos de cálculos.

Todos los cálculos ejemplos se presentan para la serina. De igual manera se realizaron para los demás aminoácidos.

Cálculo típico de la concentración del estándar del aminoácido serina.

$$[\text{ser}] = 0,0271\text{g} \cdot (1\text{mol}/105,1\text{g}) \cdot (1/0,05\text{L}) \cdot (1\text{E}+6\mu\text{mol}/\text{mol}) = 5156,9932$$

$$S_{[\text{ser}]} = 5156,9932 \left[(0,0002/0,0271)^2 + (0,05/50)^2 \right]^{1/2} = 38$$

$$[\text{ser}] = 5156 \pm 38 \mu\text{M}$$

Concentración de los patrones de serina (ser)

La concentración de las soluciones de patrón de ser se determinó a partir de la ecuación 1.

$$(\text{ec. 1}) \quad \longrightarrow \quad C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad \longrightarrow \quad C_2 = (C_1 \cdot V_1) / V_2$$

$$C_1 = 5156 \mu\text{M}; \quad V_1 = V_{\text{aliquota}}; \quad C_2 = C_{\text{patrón}}; \quad V_2 = V_{\text{total}} = 500 \mu\text{L}$$

Concentración de serina en las muestras de orina.

Para la determinación de la concentración de serina en las muestras de orina se utilizó la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración. La determinación de los demás aminoácidos se realizó de la misma manera con la curva correspondiente para cada uno.

$$\text{Ec. 2} \quad \longrightarrow \quad y = 76155x - 23696$$

$$\text{Señal obtenida para una muestra (área)} \quad A = 3022596$$

$$\text{Sabido que de la curva de calibración} \quad y = A \text{ y } x = [\text{ser}]$$

Entonces:

$$[\text{ser}]_{\text{diluida}} = (A+23696)/76155 = 40,00 \mu\text{M}$$

$$[\text{ser}]_{\text{real}} = 40,00 * (500/100) = 200,00 \mu\text{M}$$

Resolución de los picos de isoleucina

La resolución del pico se realizo utilizando la ecuación 3

A: Analito retenido

B: Analito menos retenido

$$R_S = t_{RA} - t_{RB} / [0,5 * (W_A + W_B)]$$

$$R_S = 52,950 - 51,767 / 0,5 * (1,6) = 1,25$$

Anexo 5. Cromatogramas de algunas muestras.

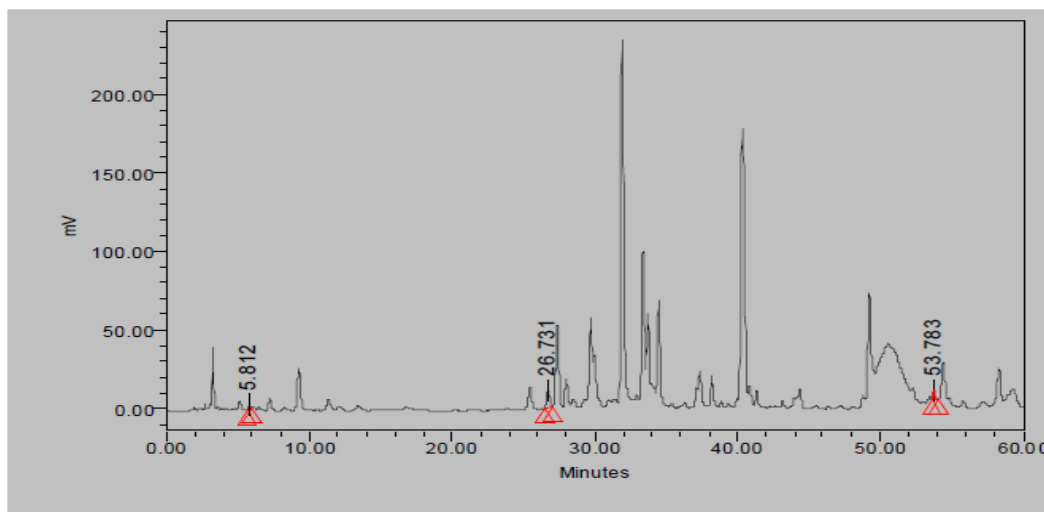


Figura 27. Muestra 69

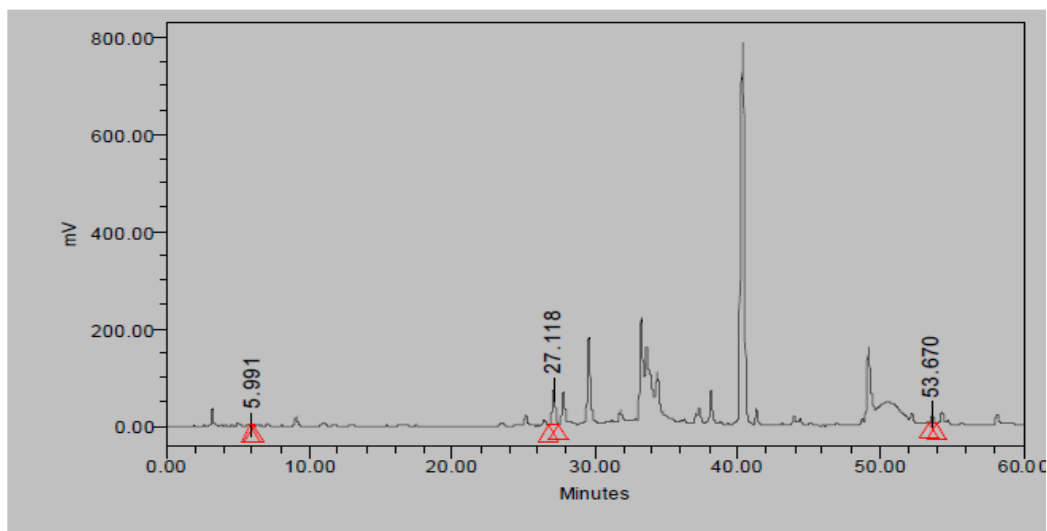


Figura 28. Muestra 78

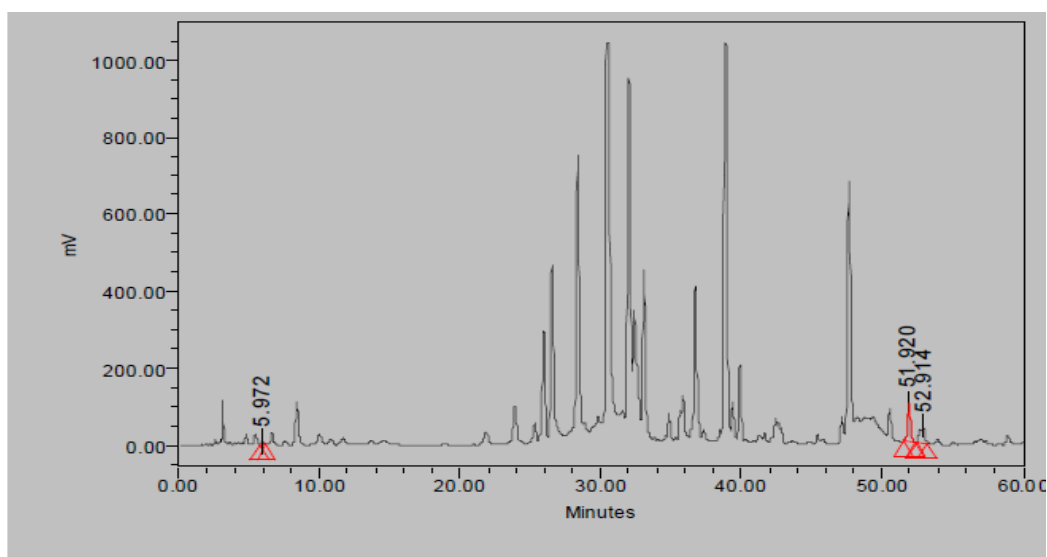


Figura 29. Muestra 26

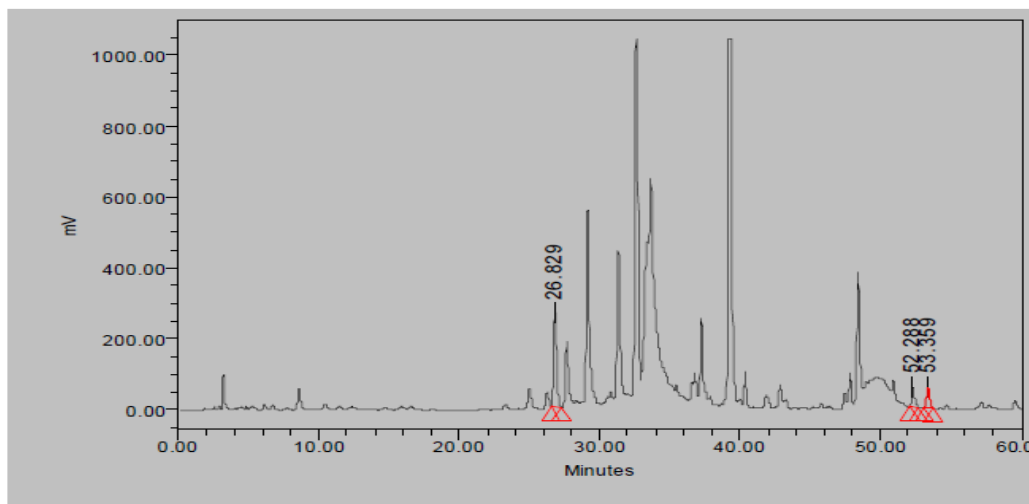


Figura 30. Muestra 14

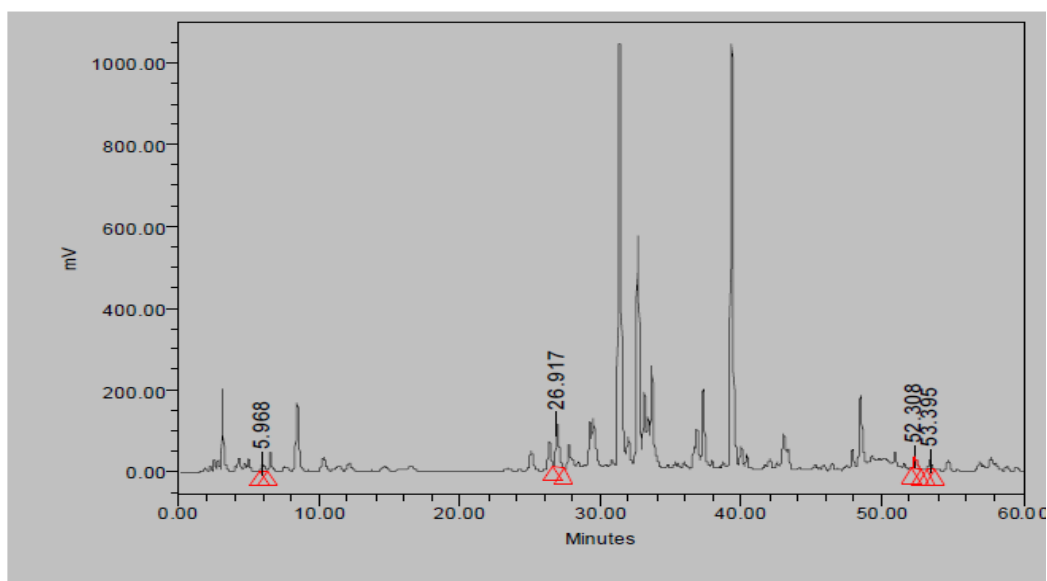


Figura 31. Muestra 33

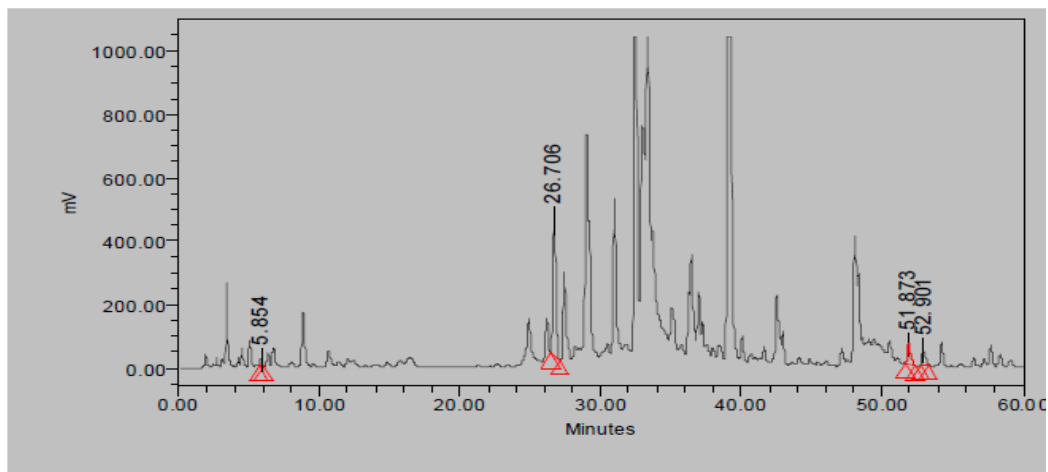


Figura 32. Muestra 15

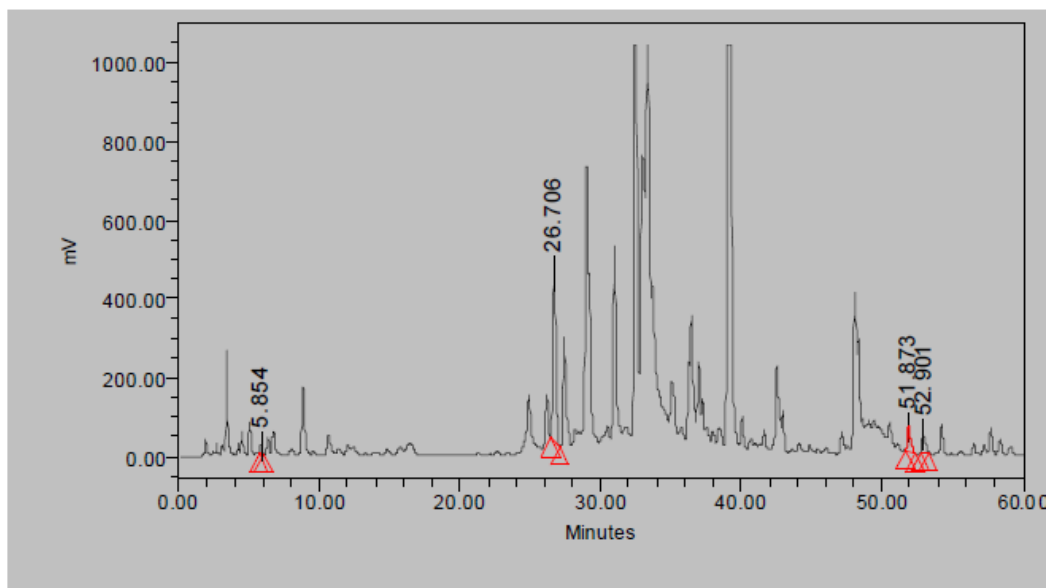


Figura 33. Muestra 22

