

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ISOLEUCINA EN ORINA COMO UN  
BIOMARCADOR DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Trabajo Especial de Grado presentado ante la  
Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la  
**Br. Claudia Montes Barcenas**, para optar al  
título de Licenciado en Química.

Caracas, Mayo de 2011

Yo Profesora Nereida Carrión, Investigadora del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y el Profesor Andrés Escalona, Investigador del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ISOLUECINA EN ORINA COMO UN BIOMARCADOR DE CÁNCER DE PRÓSTATA”**

Que presenta la Br. Claudia Montes Barcenas, 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 nuestra dirección, durante los años 2010 y 2011, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Mayo del 2011

---

Dra. Nereida Carrión

(Tutor)

---

Dr. Andrés Escalona

(Tutor)

## ACTA

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: **“ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ISOLUECINA EN ORINA COMO UN BIOMARCADOR DE CÁNCER DE PRÓSTATA”**. Presentado por la Br. Claudia Montes Barcenas, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

---

Dr. Nereida Carrión  
(Director)

---

Dr. Andrés Escalona  
(Director)

---

Dr. Vanda Lopéz  
(Jurado)

---

Dr. Miguel Murillo  
(Jurado)

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer a Dios por su infinito amor y generosidad. Sin duda alguna no habría podido sin él.

En la vida podre agradecer a mis padres **Aida** y **Jorge** por el amor, comprensión y apoyo brindado. En realidad no existen las palabras para describir el amor que les tengo, son mi más grande motivación y gracias a sus esfuerzos he podido alcanzar esta meta.

A mi hermana **Karina**, te amo infinitamente. Gracias por recorrer conmigo este camino.

A mis tutores, profesores **Nereida Carrión** y **Andrés Escalona**, por su orientación y dedicación. Gracias por la confianza que en mi depositaron. Los admiro y aprecio mucho.

Mi admiración y gratitud al grupo de profesores del **Centro de Química Analítica (CQA)**, por su valiosa ayuda y sabios consejos.

A mi amiga **Maribel** a quien admiro, quiero muchísimo y debo agradecer de manera especial por haber confiado tanto en mi y haberme guiado en la realización de este trabajo.

A mi querida **Irelui**, por ser una amiga incondicional y sobre todo un ser humano maravilloso. Sinceramente, me siento agradecida con Dios por tenerte en mi vida.

Mi **Debbie** querida, no puedo dejar de reconocer y agradecer tu valiosa amistad, gracias por simplemente existir amiga, sinceramente no hay una palabra que defina lo importante que eres para mi.

A mis amigos **Karla, Rosangel, Virginia, César, Jonathan, Manuel y Carmela**, han sido un apoyo sumamente importante y nada sería igual sin ustedes en mi vida. Los quiero.

## RESUMEN

El cáncer de próstata se considera un problema de salud a nivel mundial y representa la segunda causa de muerte por cáncer en hombres. Actualmente, en un esfuerzo por reducir estas cifras, se han realizado trabajos de investigación enfocados en el estudio de los niveles de aminoácidos como potenciales biomarcadores para el diagnóstico precoz del carcinoma prostático. En este sentido, se planteó como objetivo, determinar los niveles del aminoácido Isoleucina (ILE) en orina de pacientes con cáncer de próstata y sujetos sanos. Las muestras de orina fueron donadas por pacientes voluntarios del servicio de Urología del Hospital Universitario de Caracas (HUC) de la Universidad Central de Venezuela (UCV), antes de realizarse la biopsia prostática. El grupo de sujetos sanos o grupo control, corresponde a individuos con un valor sérico de Antígeno Prostático Específico (PSA) menor a 4,0 ng/ml, y con un diagnóstico de próstata sana de acuerdo con el examen de tacto rectal.

Se analizaron treinta y cinco (35) muestras de orina: once (11) pacientes con cáncer (Grupo 1), diecisiete (17) pacientes sin cáncer y que pueden presentar alguna patología en la próstata (hiperplasia prostática o prostatitis), por lo cual se deben realizar una nueva biopsia en un período de seis meses (Grupo 2) y siete (7) individuos sanos o grupo control (Grupo 3).

Para la determinación de ILE en la orina, se empleó como técnica de análisis la Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia (HPLC), con detección UV y derivación precolumna con o-ftaldialdehído (OPA) -ácido-2-mercaptoetanónico.

El método resultó sensible para un límite de detección y cuantificación de 17 y 57  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente. El porcentaje de recuperación obtenido fue de  $97 \pm 1\%$ , y se considera aceptable para el rango establecido en muestras de fluidos biológicos (80-120) %.

La curva de calibración empleada para la determinación del aminoácido ILE fue lineal para un rango de 101,8 - 600,8  $\mu\text{M}$ , obteniéndose que ILE es excretado en orina por el 57,1 % de los pacientes sometidos a la biopsia prostática, en un rango de 17 - 1541  $\mu\text{mol/L}$ . Mientras que en el grupo de pacientes sin afecciones en la próstata, no se detectó ILE en la orina.

## ÍNDICE

### CAPÍTULO I

I.1 EL CÁNCER.....	1
I.1.1 Tumores Benignos .....	2
I.2.1 Tumores Malignos.....	2
I. 2 LA PRÓSTATA.....	4
I.2 Zonas de la próstata .....	5
I.3 CÁNCER DE PRÓSTATA.....	6
I.3.1 Factores de riesgo.....	7
I.3.2 Síntomas.....	9
I.3.3 Diagnóstico.....	9
I.3.4 Cáncer de próstata en Venezuela.....	10
I.4 BIOMARCADORES.....	13
I.4.1 Clasificación de los biomarcadores.....	14
I.4.1.1 Marcadores de exposición.....	14
I.4.1.2 Marcadores de respuesta.....	14
I.4.1.3 Marcadores de susceptibilidad.....	14
I.4.2 Marcadores biológicos de cáncer.....	15
I.4.2.1 Utilidad clínica de los biomarcadores biológicos de cáncer.....	16
I.5 AMINOÁCIDOS.....	17
I.5.1 Isoleucina.....	18
I.5.1.1 Técnicas para el análisis de aminoácidos.....	19
I.5.2 Métodos cromatográficos.....	19
I.5.2.1 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).....	19
I.5.2.1 Ventajas y desventajas de (HPLC).....	20
I.5.2.2 Tipos de cromatografía (HPLC).....	20
I.5.3 Derivación de aminoácidos.....	23
I.5.3.1 Oftaldialdehído (OPA).....	23

I.5.4 Instrumentación para cromatografía de líquidos (HPLC).....	26
I.5.4.1 Sistema para el tratamiento de la fase móvil.....	26
I.5.4.1.1 Sistema de bombeo de la fase móvil.....	27
I.5.4.2 Sistema de inyección de la muestra.....	27
I.5.4.3 Columnas.....	28
I.5.4.4 Detectores.....	29
I.5.4.5 Estación de trabajo.....	30
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>31</b>
Revisión Bibliográfica.....	31
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>35</b>
Objetivo General.....	35
Objetivos Específicos.....	35
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>36</b>
IV.1 Instrumentación.....	36
IV.2 Materiales.....	38
IV.3 Reactivos.....	38
IV.3.1 Fase Móvil.....	38
IV.3.2 Soluciones patrón.....	38
IV.4 Derivación de la isoleucina.....	39
I.V.5 Recolección de muestras.....	39
I.V.6 Determinación de la concentración de isoleucina.....	40
I.V.7 Identificación de la isoleucina.....	42
I.V.8 Tratamiento de la muestra.....	43
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>44</b>
V.1 Optimización de las condiciones cromatográficas.....	44
V.1.1 Composición de la fase móvil.....	44
V.1.2 Volumen de inyección de inyección de la muestra.....	45
V.1.3 Flujo de la fase móvil.....	46
V.1.4 Identificación de la isoleucina en orina.....	48
V. 2 Figuras de mérito.....	49
V.2.1 Límite de detección y límite de cuantificación.....	49

V.2.2 Validación del método.....	49
V.3 Determinación de la concentración de isoleucina.....	51
V.3.1 Análisis de las muestras de orina.....	51
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>69</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Diferencias entre tumores malignos y benignos.....	3
Tabla 2.- Principales causas de mortalidad en Venezuela (2005).....	11
Tabla 3.- incidencia del cáncer de próstata en relación con otros tipos de cáncer....	12
Tabla 4.- Mortalidad del cáncer de próstata en relación con otros tipos de cáncer...	14
Tabla 5.- Relación de los marcadores tumorales más empleados.....	15
Tabla 6.- Patrones de isoleucina (ILE).....	40
Tabla 7.- Condiciones cromatográficas optimizadas para el análisis de ILE.....	41
Tabla 8.- Programación de inyección.....	41
Tabla 9.- Programas de elución para la detección de ILE.....	42
Tabla 10.- Condiciones cromatográficas optimizadas para el análisis de ILE.....	10
Tabla 11.- Áreas, alturas y tiempos para la identificación de la ILE.....	48
Tabla 12.- Figuras de mérito para el método.....	49
Tabla 13.- Porcentaje de recuperación para la determinación de ILE en orina.....	49
Tabla 14.- Parámetros para la determinación de la precisión.....	50
Tabla 15.- Áreas, alturas y tiempos de retención de los patrones de ILE.....	51
Tabla 16.- Ecuación de la curva de calibración para la determinación de ILE en las muestras.....	52
Tabla 17.- Concentraciones de isoleucina para el grupo de pacientes con diagnóstico positivo para cáncer de próstata.....	54
Tabla 18.- Concentraciones de isoleucina para el grupo de pacientes con diagnóstico negativo para cáncer de próstata.....	56
Tabla 19.- Grupo control o individuos sanos.....	58
Tabla 20.- Rangos de concentración de isoleucina para los grupos en estudio.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

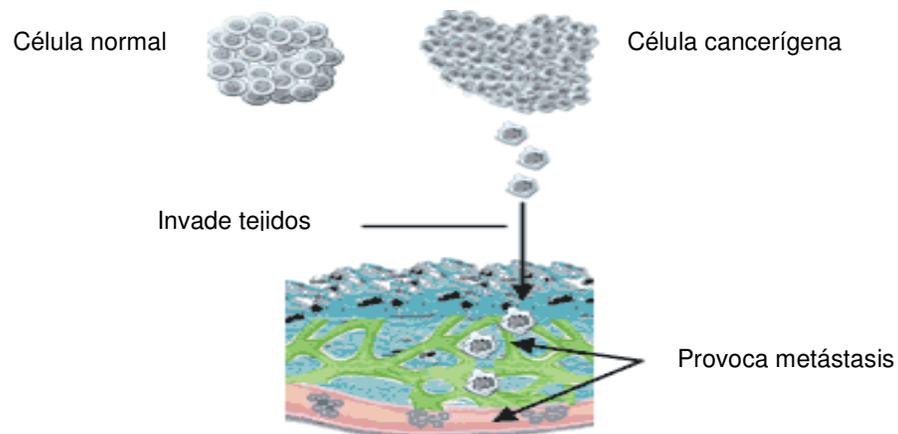
Figura 1.- Célula cancerígena en comparación con una célula normal.....	1
Figura 2.- Diseminación de las células malignas.....	2
Figura 3.- Distintos tipos de cáncer.....	4
Figura 4.- Ubicación de la próstata en el aparato reproductor masculino.....	5
Figura 5.- Zonas de la glándula prostática.....	6
Figura 6.- Glándula prostática con cáncer.....	7
Figura 7.- Estructura de la isoleucina.....	18
Figura 8.- Formación del derivado de la isoleucina y el o-ftaldehído-ácido-2- mercaptoetanoico.....	25
Figura 9.- Equipo de cromatografía de líquidos HPLC.....	26
Figura 10.- Loop de inyección de un sistema HPLC.....	28
Figura 11.- Columna para HPLC.....	29
Figura 12.- Cromatograma de una mezcla de compuestos.....	30
Figura 13.- Equipo de HPLC Hewlett Packard HP1100.....	37
Figura 14.- Curva de calibración para le determinación de ILE.....	40
Figura 15.- Programación isocrática (A) 78/22 SA/SB, (B) 95/5 SA/SB Programación con gradiente (C) 78/22 SA/SB a 85/15 SA/SB.....	45
Figura 16.- Volumen de inyección de ILE (A) 25 µL, (B) 10 µL, (C) 3 µL.....	46
Figura 17.- Flujo de fase móvil (A) 0,8 mL/min (B) 1,2 mL/min.....	47
Figura 18.- (A) Muestra no enriquecida, (B) Muestra enriquecida.....	48
Figura 19.- Muestra de orina para la determinación de la precisión del método.....	50
Figura 20.- Muestra con concentración de ILE mayor a 17 µmol/L (LOD).....	53
Figura 21.- Muestra con concentración de ILE menor a 17 µmol/L (LOD).....	53
Figura 22.- Distribución por intervalos de concentración de ILE.....	59
Figura 23.- Concentración de ILE en relación con la edad.....	60
Figura 24.- Concentración de ILE en relación con el grado de Gleason.....	61
Figura 25.- Diagrama de caja y bigotes de los grupos en estudio.....	62
Figura 26.- Intervalos de concentración de isoleucina para los grupos de pacientes analizados con respecto a los reportados por Hernández <sup>[33]</sup> .....	64

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### I.1 EL CÁNCER

El Cáncer es un término genérico para un grupo de muchas enfermedades relacionadas que se caracterizan por el desarrollo de células que se dividen y crecen sin control en cualquier parte del organismo. Todos los organismos están compuestos por una o más células y en general, se dividen para producir más células sólo cuando el cuerpo lo necesita. En el cáncer, por el contrario, se genera una alteración de este equilibrio y las células adquieren una autonomía que escapa generalmente a los mecanismos normales de proliferación celular <sup>[1], [2]</sup>. Cuando las células normales se transforman en cancerígenas (carcinogénesis), adquieren la capacidad de invadir tejidos y otros órganos, en un proceso denominado metástasis (**Figura 1**).



**Figura 1.- Célula cancerígena en comparación con una célula normal.**

En el proceso de transformación progresiva de las células normales en células cancerosas, estas últimas se vuelven contra los tejidos que le dieron origen,

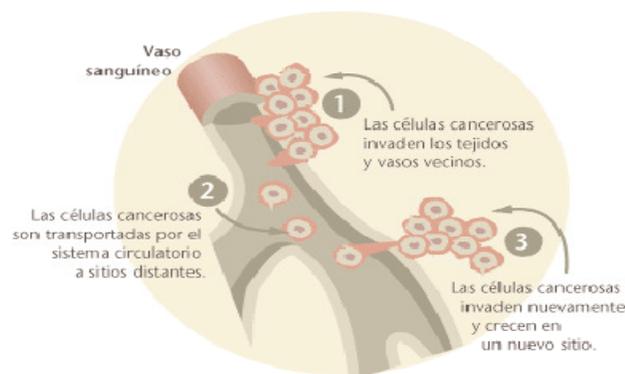
infiltrándolos y destruyéndolos, al formar una masa de tejido llamado tumor <sup>[3]</sup>. No todos los tumores son cancerosos, los tumores pueden ser benignos o malignos.

### I.1.1 TUMORES BENIGNOS

Los tumores benignos son tumores bien definidos y se consideran no cancerosos. Además, no poseen la capacidad de invadir el tejido circundante o diseminarse a otros órganos, y son de lento crecimiento. Generalmente, pueden extirparse quirúrgicamente y en la mayoría de los casos no reaparecen <sup>[3]</sup>, <sup>[4]</sup>.

### I.1.2 TUMORES MALIGNOS

El término cáncer por lo general se reserva para los tumores malignos. Las células de los tumores malignos se caracterizan por tener una gran capacidad de reproducirse y por esa facultad, el tumor que se produce puede invadir tejidos y órganos cercanos al mismo. Cuando alguna de estas células se separa del tumor puede entrar a la circulación sanguínea o linfática (**Figura 2**). Este es el medio por el cual la célula puede llegar a tejidos y órganos distantes, diseminando la enfermedad (metástasis), y una vez instalada en esos tejidos y órganos normales, comienza a reproducirse con la misma velocidad que el tumor primitivo <sup>[3]</sup>, <sup>[4]</sup>. Otro término utilizado para este tipo de tumor es el de neoplasia.



**Figura 2.- Diseminación de las células malignas.**

En la tabla 1 se señalan las principales diferencias entre los tumores benignos y malignos.

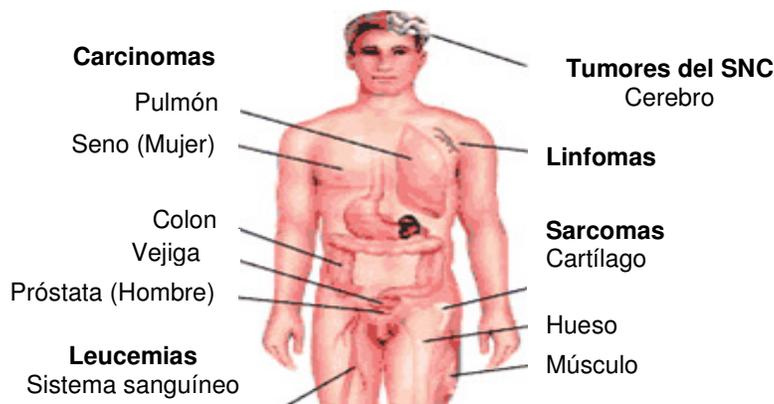
**Tabla 1.- Diferencias entre tumores benignos y malignos.**

<b>Características</b>	<b>Benigno</b>	<b>Maligno</b>
Diferenciación	Bien diferenciado con estructura típica del tejido que le dio origen	Indiferenciación y estructura atípica
Tasa de Crecimiento	Lenta y progresiva, puede ser estática	Errática, puede ser lenta o rápida
Invasión Local	No infiltra los tejidos	Invasivo localmente, destruye los tejidos
Metástasis	Ausentes	Con frecuencia presentes

El cáncer puede originarse en cualquier parte del cuerpo. En general, los tumores son llamados según los tejidos u órganos en los cuales se originan, de acuerdo con este criterio existen cuatro extensas clasificaciones de cáncer.

El **Carcinoma** es el cáncer que se origina a partir de células epiteliales, las cuales cubren las superficies externas e internas del cuerpo. Un subgrupo de carcinomas son los adenocarcinomas, tumores que aparecen en el tejido epitelial de una glándula. La mayoría de los cánceres de riñón, próstata, y seno son ejemplos de adenocarcinomas. Otros cánceres epiteliales son los de célula escamosa (Ejemplo: pulmón, cavidad oral o piel) y carcinomas transicionales (del recubrimiento de la vejiga). El **Sarcoma** es el cáncer que surge de las células que se encuentran en los tejidos conectivos del cuerpo, como huesos, cartílagos, grasa y músculos. Los más frecuentes son los sarcomas óseos. Entre otros tipos de cáncer se encuentran: el cáncer **Hematológico**, el cual procede de las células que forman la sangre en la médula ósea y pueden encontrarse en la sangre o en el sistema linfático, entre estos se encuentran: leucemias, linfomas y mielomas múltiples; y del **Sistema nervioso**

**central (SNC)**, se producen en el cerebro o en la columna vertebral y se los denomina de acuerdo con el tipo específico de tejido del cual surgen <sup>[5]</sup>, <sup>[6]</sup>. La figura 4 ilustra la clasificación de los diferentes tipos de cáncer.



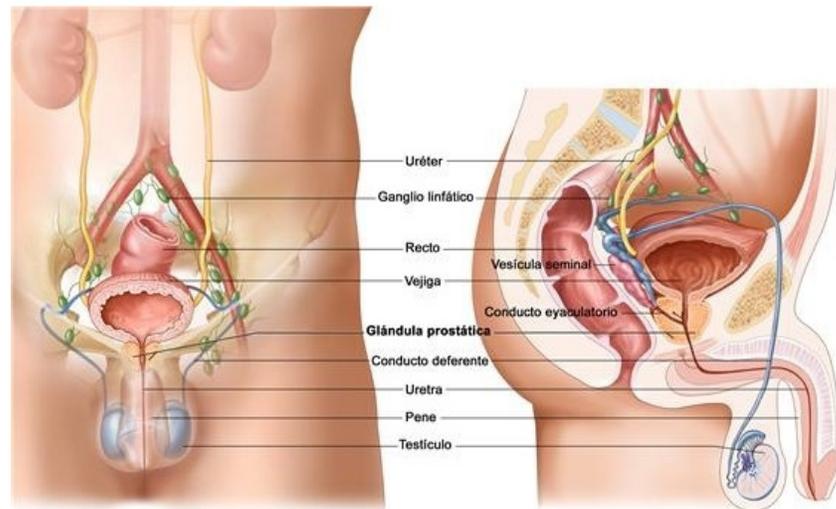
**Figura 3.- Distintos tipos de cáncer.**

De los tipos de cáncer antes mencionados es de interés para este proyecto de investigación el de tipo carcinoma, específicamente el cáncer de próstata. Es por ello que, primeramente, se presentará una breve descripción de la próstata.

## I.2 LA PRÓSTATA

La próstata es una de las glándulas sexuales masculinas. Es un órgano glandular que se asemeja en forma y tamaño a una nuez. Está ubicada encima del recto y por debajo del cuello de la vejiga urinaria, recubriendo totalmente la uretra masculina (conducto común del aparato urinario y genital en el hombre) <sup>[7]</sup> (**Figura 4**). Hasta la pubertad la próstata está poco desarrollada, pero a partir de ésta, comienza a crecer de forma rápida, llegando a pesar alrededor de 20 gramos. El tamaño de la próstata se equilibra en el adulto y es regulado principalmente por las hormonas andrógenas, en especial la testosterona. La próstata contribuye con la formación de la mayor parte de los componentes químicos del líquido seminal, los

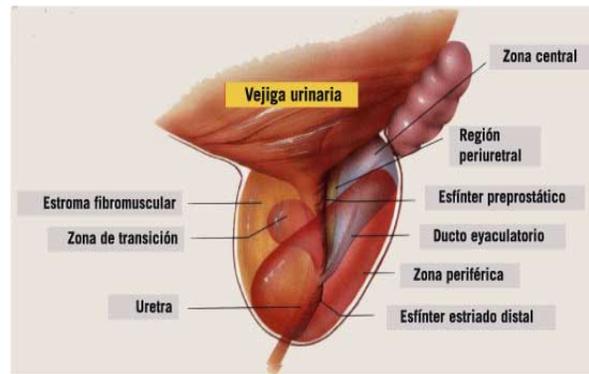
cuales tienen una función protectora contra agentes patógenos y otros factores externos nocivos que puedan penetrar a través de la uretra<sup>[8]</sup>.



**Figura 4.- Ubicación de la próstata en el aparato reproductor masculino.**

### **I.2.1 ZONAS DE LA PRÓSTATA**

En la próstata se pueden distinguir tres zonas principales (**Figura 5**). La zona periférica, compuesta por aproximadamente un 65% de tejido glandular y es la región de origen del 80% de los carcinomas. La zona central con un 25% de tejido glandular, es la región predominante de las infecciones o **Prostatitis**, la cual ocasiona una inflamación en la próstata. La zona de transición constituida por un 10% de tejido glandular, es el sitio de origen de la **Hiperplasia Benigna de Próstata o HPB**, la cual consiste en el aumento anormal del tamaño de la próstata, ocasionado por un incremento de células no cancerosas, y puede ser una consecuencia natural del envejecimiento. Es una de las enfermedades más frecuentes en el hombre, suele dificultar la emisión de orina y producir retención urinaria<sup>[8], [9], [10], [11]</sup>.



**Figura 5.- Zonas de la glándula prostática.**

Los problemas en la próstata y antes mencionados, suelen aparecer a partir de los 50 años de edad, y se deben fundamentalmente al lento pero progresivo crecimiento de la glándula por efecto de la hormona masculina, testosterona. El aumento del tamaño de la próstata puede ser de carácter benigno o maligno.

### **I.3 CÁNCER DE PRÓSTATA**

El cáncer de próstata es un tumor maligno que se desarrolla en la glándula prostática. Consiste en un crecimiento descontrolado de las células en los tejidos de la próstata, y se origina usualmente en la zona periférica <sup>[12]</sup>. Se desarrolla principalmente en hombres de edad avanzada. En la mayoría de los casos crece muy lentamente y es asintomático, cuando los síntomas se presentan, pueden ser los mismos producidos por otras enfermedades (prostatitis e hipertrofia prostática benigna [HPB]). En algunos hombres puede que crezca con rapidez y se extienda a otras partes del cuerpo (**Figura 6**). Es la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres, después del cáncer del pulmón <sup>[7], [12], [13]</sup>.



**Figura 6.- Glándula prostática con cáncer.**

### **I.3.1 FACTORES DE RIESGO**

Las causas del cáncer de próstata se consideran desconocidas, sin embargo se han identificado factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer la enfermedad. Los principales factores que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de próstata son los factores genéticos, nutricionales, ambientales y hormonales <sup>[9]</sup>.

**Edad.** La probabilidad de tener cáncer de próstata aumenta rápidamente después de los 50 años. La incidencia se acrecienta con la edad, más del 75% de los cánceres de próstata son diagnosticados en hombres mayores de 65 años. Muy probablemente porque con la edad aumenta la acumulación de factores de riesgo, los cuales se combinan con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad <sup>[1], [9]</sup>.

**Historia familiar y factores genéticos.** El cáncer de próstata ocurre más frecuentemente en algunas familias, sugiriendo que existe un factor hereditario. Los familiares de primer grado de un enfermo con cáncer de próstata, como hijos o hermanos, tienen el doble de riesgo que la población general.

**Raza.** El cáncer de próstata ocurre alrededor del 70% más a menudo en hombres afroamericanos que en hombres blancos americanos. Los hombres de ascendencia asiática tienen las tasas más bajas de incidencia y mortalidad.

**Factores socioeconómicos.** La imposibilidad de acceder a exámenes preventivos aumenta el riesgo de desarrollar el cáncer de próstata, o de no diagnosticarlo oportunamente facilitando la producción de metástasis.

**Factores hormonales.** Se han realizado numerosos estudios con la finalidad de demostrar la posible influencia de las hormonas masculinas en la etiología del cáncer de próstata. El crecimiento y las funciones de la glándula prostática dependen de las hormonas sexuales y se han encontrado elevados niveles de andrógenos circulantes en el cáncer de la próstata.

**Factores dietéticos.** El cáncer de la próstata como el cáncer de mama y el cáncer de colon están vinculados al elevado consumo de grasas. Esta relación con las grasas reúne a estos cánceres como cánceres de la sobre nutrición y de la obesidad.

**Actividad sexual.** Cuando se estudia la actividad sexual en relación con el cáncer de la próstata, aparece como más frecuente el cáncer en los hombres con vida sexual más activa, tanto por la mayor frecuencia del coito como por el mayor número de compañeras sexuales. Incluso se ha observado una mayor frecuencia de enfermedades venéreas en el pasado de los hombres afectados por el cáncer de la próstata. Otros estudios al contrario han sugerido que existe un mayor riesgo de cáncer prostático asociado con la represión de la actividad sexual, como un comienzo en edad más tardía, y un cese prematuro de la actividad sexual.

**Exposición a agentes químicos.** La exposición a cadmio, dimetilformamida y acrilonitrilo puede elevar el riesgo de desarrollar cáncer de próstata. También se ha sugerido que los granjeros tienen mayor riesgo de desarrollar este cáncer. El

riesgo aumenta con las actividades relacionadas con pintura y barniz, exposición a grasas y lubricantes, polvo de metal, pesticidas y en profesiones relacionadas con el mantenimiento de casas y muebles.

### **I.3.2 SÍNTOMAS**

En las primeras etapas del cáncer de próstata, pueden no producirse síntomas. Según crece el tumor pueden notarse ciertos síntomas, incluyendo:

- Necesidad de orinar frecuentemente.
- Dificultad para comenzar la micción o detenerla.
- Interrupción del flujo de orina o un flujo débil.
- Micción dolorosa o con ardor.
- Sangre en la orina.
- Goteo al final de la micción.
- Dificultad para tener una erección.
- Eyaculación dolorosa.
- Dolor continuo en la parte baja de la espalda, en la pelvis, o en la zona superior de los muslos.

Cualquiera de estos síntomas pueden presentarse cuando existe cáncer, sin embargo, existe la posibilidad de que otras enfermedades ocasionen los mismos síntomas. En realidad, es más frecuente que cualquiera de estas molestias esté relacionada con la hipertrofia prostática benigna que con el cáncer<sup>[13]</sup>. Actualmente, se emplea principalmente para el diagnóstico del cáncer de próstata, la prueba del antígeno prostático específico o PSA.

### **I.3.3 DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico del cáncer de próstata se lleva a cabo por la prueba en [sangre](#) del antígeno prostático específico, llamado PSA (acrónimo inglés de prostate-

specific antigen), en líneas generales, se considera como rango normal de PSA sérico el rango comprendido entre 0-4 ng/ml. Sin embargo, el PSA presenta ciertas limitaciones en el diagnóstico precoz del cáncer de próstata, ya que los niveles también pueden elevarse por otras patologías diferentes del cáncer <sup>[12]</sup>.

Además de la prueba de PSA en sangre, se realiza como prueba estándar para la detección del cáncer de próstata, el tacto rectal, el cual consiste en la exploración física de la glándula prostática. Si en esta prueba se observa alguna anomalía, la siguiente prueba que se debe realizar es la ecografía transrectal. La ecografía transrectal es útil para evaluar el tamaño y la forma de la próstata. Los resultados sospechosos típicamente dan lugar a la posterior extracción de una muestra tisular de la próstata, denominada biopsia <sup>[13]</sup>.

El cáncer de próstata representa un problema global importante de salud pública, no sólo por sus manifestaciones clínicas y alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo con los que se asocia. Es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres, y su incidencia continúa aumentando en muchas regiones del mundo <sup>[1]</sup>.

#### **I.3.4 CÁNCER DE PRÓSTATA EN VENEZUELA**

En general, el cáncer constituye en Venezuela una de las causas más frecuentes de enfermedad, ocupando la segunda posición en los índices de mortalidad detrás de las enfermedades del corazón (tabla 2) <sup>[14]</sup>.

**Tabla 2.- Principales causas de mortalidad en Venezuela (2005).**

<b>Causa de muerte</b>	<b>%</b>
Enfermedades del corazón	20,71
<b>Cáncer</b>	<b>14,93</b>
Enfermedades Cerebrovasculares	7,4
Suicidios y Homicidios	7,31
Accidentes de otro tipo	7,19
Otras causas	42,05

No todas las localizaciones de cáncer ocurren con la misma frecuencia. El cáncer de próstata rara vez ocurre antes de los 55 años de edad. La mayoría de los hombres diagnosticados tienen 65 años o más.

Según los datos estadísticos publicados en el Anuario Epidemiológico de 2005(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, el cáncer de próstata es el más frecuente en la población masculina, con una incidencia estimada en 4.408 casos anuales. Seguido por el de pulmón (1.983casos), estómago y el de colon y recto (1.006). Estas cuatro localizaciones representan aproximadamente el 56%de la morbilidad o incidencia anual de esta patología, (tabla 3) <sup>[15]</sup>.

**Tabla 3.- Incidencia del cáncer de próstata en relación con otros tipos de cáncer.**

<b>Localizaciones</b>	<b>%</b>
<b>Próstata</b>	<b>27,56</b>
Bronquios y pulmones	12,13
Estómago	8,68
Colon, recto y ano	7,36
Leucemias	5,18
Hígado	2,73
Páncreas	2,03
Linfomas no Hodgkin	3,56
Laringe	5,41
Encéfalo, meninges y otros SNC	1,79
Riñón, etc.	2,36

Capote, L. Frecuencia del Cáncer en Venezuela. Fascículo N° 2, publicado por Banco de Drogas Antineoplásicas, 2008.

Respecto a los índices de mortalidad, las primeras posiciones están ocupadas igualmente por las mismas variedades de cáncer. La diferencia entre el cáncer de próstata y el de pulmón es muy estrecha (1.710 y 1.799 muertes anuales respectivamente), lo cual contrasta con la morbilidad, pues la incidencia de cáncer de próstata supera ampliamente al de pulmón. Esto se debe a que el primero tiene un porcentaje de curación significativamente más alto que el segundo, (tabla 4) <sup>[15]</sup>.

**Tabla 4.- Mortalidad del cáncer de próstata en relación con otros tipos de cáncer.**

<b>Localizaciones</b>	<b>%</b>
<b>Próstata</b>	<b>19,44</b>
Bronquios y pulmones	18,13
Estómago	11,84
Colon, recto y ano	6,36
Leucemias	4,65
Hígado	3,92
Páncreas	3,69
Linfomas no Hodgkin	3,29
Laringe	3,02
Encéfalo, meninges y otros SNC	2,29
Riñón	2,17
Esófago	2,03

Capote, L. Frecuencia del Cáncer en Venezuela. Fascículo N° 2, publicado por Banco de Drogas Antineoplásicas, 2008.

El cáncer de próstata se encuentra en primera posición, con un total de 1 766 defunciones, representando casi el 20 % de la mortalidad por cáncer en este género, seguido de pulmón, estómago, colon y recto <sup>[14]</sup>. En Venezuela cada año se presentan 4 mil 400 nuevos casos de cáncer de próstata, y de éstos fallece el 50%, lo que deja clara la importancia de prevenir la patología prostática maligna.

#### **I.4 BIOMARCADORES**

Un biomarcador o marcador bioquímico es una sustancia presente en la sangre o fluidos del cuerpo - como la orina o la saliva - y algunos tejidos, cuya presencia o cantidad es indicadora de alguna patología en el organismo. Tienen

especial interés en la evaluación de enfermedades progresivas donde los síntomas se manifiestan tras un largo periodo de tiempo <sup>[16]</sup>.

#### **I.4.1 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES**

Los marcadores biológicos se clasifican, por lo general, en tres tipos concretos: exposición, de susceptibilidad y de respuesta (o efecto) <sup>[17]</sup>.

##### **I.4.1.1 MARCADORES DE EXPOSICIÓN**

Un marcador de exposición se puede considerar como un compuesto exógeno (o un metabolito) que se introduce en el organismo y refleja la exposición de éste a un componente endógeno, o cualquier otro hecho relacionado con la exposición. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente). Bernard y Lauwerys, dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición <sup>[17]</sup>.

##### **I.4.1.2 MARCADORES DE RESPUESTA**

Son componentes endógenos o cualquier otro indicador del estado de un organismo afectado por la exposición.

##### **I.4.1.3 MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD**

Permiten identificar a los individuos más susceptibles a daños, por lo tanto, son indicadores de una limitación inherente o adquirida de la capacidad de un organismo para responder a la exposición a una sustancia específica <sup>[17], [18]</sup>.

Actualmente los marcadores se han constituido como la mejor opción para pronosticar precozmente la existencia de cáncer en el organismo.

#### I.4.2 MARCADORES BIOLÓGICOS DE CÁNCER

Los marcadores biológicos de cáncer son sustancias producidas por el tumor o en estrecha relación con su presencia, cuya cantidad aumenta por encima de valores fisiológicos por efecto de éste. Estas sustancias se pueden encontrar en la sangre, orina, tejidos de tumor o en otros tejidos. Se pueden definir además como marcadores tumorales, debido a que ofrecen información de interés clínico sobre el estado de la enfermedad <sup>[19]</sup>.

Hasta la fecha, los investigadores han identificado más de doce sustancias que parecen expresarse en forma anormal cuando ciertos tipos de cáncer están presentes. Existen muchos diferentes marcadores tumorales. Algunos son vistos en un solo tipo de cáncer, mientras que otros pueden encontrarse en muchos tipos de la enfermedad. En la tabla 5 se señala una relación de los marcadores biológicos de cáncer más empleados en la actualidad.

**Tabla 5.- Relación de los marcadores tumorales más empleados.**

<b>Marcador</b>	<b>Tumores en los que está indicada su determinación</b>
AFP	Tumores germinales, cáncer de hígado
Bata 2- microglobulina	Mieloma múltiple
CA 15.3	Cáncer de mama
CA 19.9	Cáncer de páncreas, estómago y pulmón
CA 72.4	Cáncer de estómago
CA 125	Cáncer de ovario, endometrio y pulmón
Calcitonina	Cáncer medular de tiroides
CEA	Cáncer de colon y recto, mama, pulmón, estómago

CYFRA 21-1	Cáncer de pulmón
Beta HCG	Tumor trofoblástico, tumor de células germinales
NSE	Cáncer de pulmón
<b>PSA</b>	<b>Cáncer de próstata</b>
SCC	Cáncer de cérvix, laringe
Tiroglobulina	Cáncer de tiroides

---

<http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/65/1500/86/1v65n1500a13055187pdf001.pdf> (Revisado, Agosto 2010).

Un marcador tumoral ideal sería aquel producido tan sólo por las células cancerosas, ya que su detección sería indicativa de la presencia de un tumor. Sin embargo, no existe un marcador biológico de cáncer que responda exactamente a esta definición, y únicamente en algunos casos se disponen de marcadores de moderada especificidad <sup>[19]</sup>.

#### **I.4.2.1 UTILIDAD CLÍNICA DE LOS MARCADORES DE CÁNCER**

El valor diagnóstico de un marcador tumoral se define por su sensibilidad y su especificidad. La principal aplicación de los marcadores biológicos de cáncer consiste en el control evolutivo de la enfermedad una vez realizado el tratamiento del tumor primitivo. Así, tras la realización de un tratamiento con finalidad curativa debe observarse una disminución en la concentración sérica del marcador hasta llegar a su normalización en un tiempo que dependerá de la vida media de cada marcador.

La utilidad de un marcador tumoral en el cribado de la enfermedad debe considerarse no sólo su eficacia diagnóstica, sino también su incidencia en la supervivencia y mortalidad debida al tumor.

Debido a que se trata de sustancias que no son específicas de la transformación neoplásica, no debe extrañar que los marcadores biológicos de cáncer puedan detectarse, si bien generalmente en muy baja concentración, en sujetos sanos. Tampoco debe sorprender que puedan observarse niveles elevados

en pacientes con diversas enfermedades no neoplásicas. Por ejemplo, la determinación del PSA para discriminar el cáncer de próstata es controvertida, y así, existen sociedades, como la American Cancer Society y la American Urological Association, que recomiendan su determinación anual en sujetos de más de 50 años, mientras que otras sociedades desestiman su uso <sup>[19]</sup>.

En la actualidad se están buscando biomarcadores más específicos, que permitan detectar a tiempo el cáncer en los siguientes órganos: colon, hígado, riñón, próstata, vejiga, mama, pulmón, páncreas y esófago. Esta nueva red permite unificar esfuerzos para conseguir aplicar las últimas tecnologías en esta compleja búsqueda de biomarcadores, que es un paso crucial en la batalla contra el cáncer. Una vez identificados, los nuevos biomarcadores podrán detectar la existencia de un cáncer y otras enfermedades mucho antes que con los métodos actuales <sup>[20]</sup>.

## I.5 AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que se combinan para formar las proteínas. Estas moléculas son anfóteras; es decir, pueden actuar como ácido o como base, y poseen varias funciones biológicas importantes <sup>[21]</sup>. Los aminoácidos se clasifican en dos grupos:

- **Aminoácidos esenciales.** Son aquellos que el cuerpo no los puede producir y tienen que ser suministrados por los alimentos.
  
- **Aminoácidos no esenciales.** Son producidos por el cuerpo a partir de los aminoácidos esenciales o la descomposición normal de las proteínas.

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: (1) apolares neutros, (2) polares neutros, (3) ácidos, (4) básicos. Siendo de particular interés los aminoácidos apolares neutros. Esta clase

de aminoácidos, contienen principalmente grupos R hidrocarbonados. El término neutro se utiliza debido a que estos grupos R no poseen cargas positivas o negativas. Las cadenas R hidrocarbonadas pueden ser: aromáticas o alifáticas, razón por la cual interaccionan poco con el agua (hidrófobos). Este grupo de aminoácidos lo conforman la Leucina, Isoleucina y Valina <sup>[21]</sup>.

### I.5.1 ISOLEUCINA

La isoleucina es uno de los ocho aminoácidos esenciales para el organismo, forma parte integral del código genético y del tejido muscular. Pertenece al grupo de aminoácidos de cadena ramificada, con cadenas laterales no polares (hidrófobos), **figura 7**. Su símbolo es I en código de una letra e Ile en código de tres letras. Es esencial para la nutrición humana, ya que regula los niveles de azúcar en sangre, interviene en la reparación muscular y en la síntesis de la hemoglobina. Una vez metabolizada, puede ser convertida en lípidos o carbohidratos. La isoleucina que necesita el ser humano, debe ser ingerida a través de la dieta. Una dieta pobre en proteínas origina carencias de isoleucina y provoca dolores de cabeza, depresión, fatiga e irritabilidad <sup>[22]</sup>. El valor específico de isoleucina en orina para adultos es de 4-23 (mμ/dL) <sup>[23]</sup>.

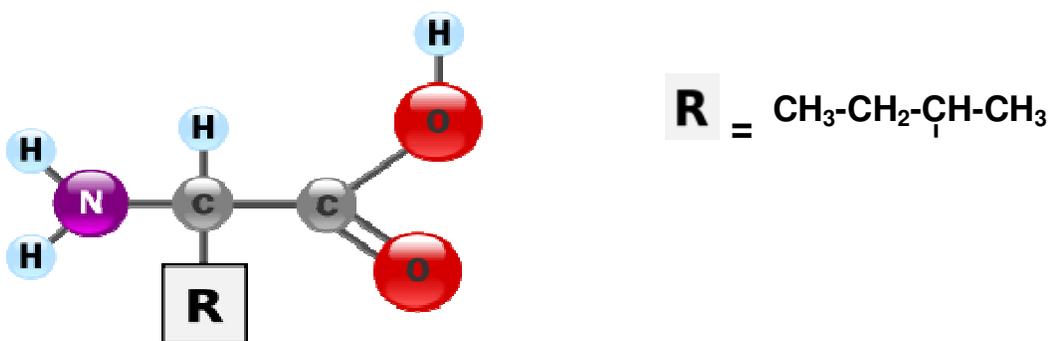


Figura 7. - Estructura de la Isoleucina.

### **I.5.1.1 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: espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) <sup>[24]</sup>, espectrometría de masas acoplada con métodos cromatográficos, como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia y la cromatografía de gases, en el caso de la cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia y UV-Visible <sup>[25], [26]</sup>.

### **I.5.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar, identificar y cuantificar, componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas.

En toda [cromatografía](#) existe un contacto entre dos fases inmiscibles, una fija que suele llamarse estacionaria, y una móvil que fluye permanente durante el proceso y puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase estacionaria puede ser [alúmina](#), [sílice](#) o resinas poliméricas químicamente modificadas, que se fija a una columna o a una superficie sólida. El principio básico de la separación se fundamenta en una serie de sucesivos equilibrios entre la fase móvil y la fase estacionaria. El equilibrio dependerá de las propiedades físicas y químicas de los componentes. Como resultado de las distintas interacciones de los componentes de la mezcla con cada una de las fases, los compuestos se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente <sup>[27]</sup>.

#### **I.5.2.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es una técnica que permite separar los distintos componentes de una mezcla a partir de las diferentes velocidades de migración de los mismos, la cual se establece al ser arrastrados por

una fase móvil líquida a través de un lecho cromatográfico que contiene una fase estacionaria, que puede ser líquida o sólida.

El modo de separación de los analitos consiste en la elución, proceso por el cual se hacen pasar los analitos a través de la columna, produciéndose interacciones de orden fisicoquímico característicos de cada compuesto, donde la fase móvil actúa como eluyente sin reaccionar con los componentes de la muestra, ni con la fase estacionaria. Es la técnica de separación más ampliamente utilizada <sup>[27]</sup>.

#### **I.5.2.1.1 VENTAJAS Y DESVENTAJAS**

Las principales ventajas de HPLC son:

- Buena sensibilidad.
- Fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas.
- Idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles.
- Análisis rápido.
- Alta resolución.
- Gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial [interés](#) en la [industria](#), en muchos campos de [la ciencia](#) y para la [sociedad](#) en general (versátil).

Algunas de las limitaciones de esta técnica son:

- Instrumentación relativamente costosa.
- Se requiere de operarios con experiencia.

#### **I.5.2.1.2 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

Según la propiedad fisicoquímica que se aprovecha para separar las especies de una mezcla se distinguen cuatro tipos básicos de cromatografía de líquidos: de reparto, de adsorción, de intercambio iónico y de exclusión por tamaño.

## CROMATOGRAFÍA DE REPARTO

Este mecanismo permite separar los distintos componentes de una mezcla por la interacción selectiva de los constituyentes de la muestra. Se aplica principalmente para separar especies poco polares, no iónicas. La cromatografía de reparto se subdivide en:

a.- Cromatografía líquido-líquido: La fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física.

b.- Cromatografía de fase químicamente modificada: La fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte sólido de sílica o base polimérica.

La cromatografía de fase químicamente modificada es la más utilizada actualmente, ya que requiere de un recubrimiento periódico de las partículas del soporte, lo cual garantiza mejores separaciones y evita el sangrado de la columna, como resultado de la pérdida de la fase estacionaria por disolución en la fase móvil. Se subdivide en:

b.1.-Fase Normal. En la cromatografía de fase normal se emplea una fase estacionaria polar, por ejemplo agua o trietilenglicol, y disolventes no polares como fase móvil.

b.2.-Fase Reversa. En la cromatografía en fase inversa se utilizan fundamentalmente disolventes polares como fase móvil, y una fase estacionaria no polar. Es más utilizada que la fase normal debido a la gran variedad de aplicaciones que posee. Algunas de las ventajas más sustanciales de esta alternativa son su gran reproducibilidad, tiempos de retención cortos, velocidad de [muestreo](#) alta, sistema cromatográfico simple y amplio campo de aplicación.

## **CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN**

La separación de los compuestos constituyentes de una mezcla se lleva a cabo a partir de la adsorción en la superficie del soporte sólido. Las fases estacionarias que se utilizan comúnmente son la sílice y la alúmina, siendo la sílice la que se prefiere, debido a su mayor capacidad de carga o de muestra. En general, es adecuada para separar especies no polares con masas moleculares inferiores a 5000 Da y en la separación de isómeros estructurales.

## **CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO**

En la cromatografía de intercambio iónico (IC), los iones del analito y los iones de carga equivalente en la fase móvil compiten por su contraparte en la fase estacionaria. De esta manera, la retención relativa de los iones está determinada por la extensión de esta competencia, la cual depende de tres variables, como son el pH, la fuerza iónica de la fase móvil y la naturaleza del intercambiador iónico.

## **CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO**

La cromatografía de exclusión por tamaño, también denominada cromatografía de permeación sobre gel o de filtración sobre geles, se basa en la separación de los analitos a partir del tamaño efectivo de las moléculas.

De las técnicas cromatográficas antes descritas, se utilizan principalmente para la determinación de aminoácidos la cromatografía de reparto en fase reversa y la cromatografía de intercambio iónico, siendo de interés para este proyecto de investigación la primera alternativa.

Un aspecto importante en el [análisis](#) de los aminoácidos es el hecho de que no se pueden detectar en el UV-visible, por esta razón es necesario recurrir a los métodos de derivación.

### I.5.3 DERIVACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Existen varios reactivos que reaccionan con los aminoácidos dando compuestos que pueden utilizarse para análisis cualitativos o cuantitativos. Esto es lo que se denomina derivación de aminoácidos <sup>[28]</sup>.

El problema de la derivación de aminoácidos está concentrado en la detección selectiva y sensible de los mismos. La derivación puede ser llevada a cabo antes de la separación. Debería ocurrir cuantitativamente para producir [productos](#) sencillos para cada aminoácido, el reactivo no debería interferir. La derivación tras la separación requiere, en general, una complejidad instrumental mayor. Los instrumentos comerciales a menudo necesitan ser optimizados para alcanzar sensibilidad de detección más alta. Los principales reactivos para la preparación de derivados de aminoácidos son: Oftaldehido (OPA), Fluorescamina, Isotiocianato de fenilo, Cloruro de dansilo, Cloruro de dabsilo y Ninhidrina. Sin embargo, es de particular interés profundizar en el primero de ellos.

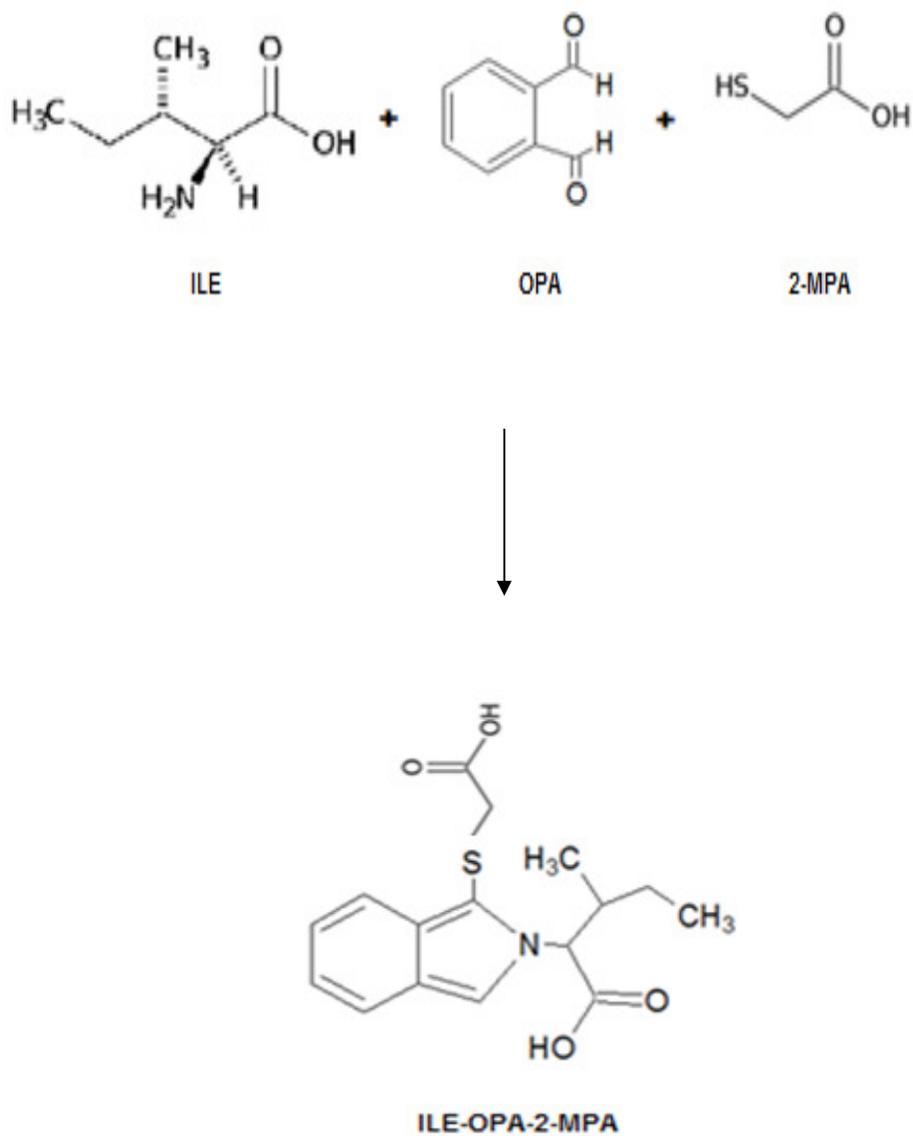
#### I.5.3.1 OFTALDEHIDO (OPA)

El OPA fue originalmente introducido como un reactivo alternativo a la ninhidrina en la derivación postcolumna y suministró un significativo incremento en la sensibilidad. Los aminoácidos reaccionan con el OPA en presencia de un reductor fuerte, en condiciones alcalinas (pH 9-11). La separación en fase reversa seguida de detección UV-visible 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 derivación postcolumna, actualmente es ampliamente usado como un agente para precolumna.

Una desventaja del OPA reside en la relativa inestabilidad de sus derivados, lo cual no es de gran dificultad en la técnica de derivación en postcolumna, sin embargo, en precolumna a un rango de pH 7-9 los productos deben ser

inmediatamente analizados en un [sistema](#) cromatográfico. La mayor desventaja del OPA es que no reacciona con aminas secundarias (prolina e hidroxiprolina) aunque esto puede ser solventado con su oxidación por cloramina-T o hipoclorito. Una estratégica combinación del uso de OPA con FMOC (9-fluorenilmetil cloroformato) ha sido recientemente introducida para solucionar esta deficiencia.

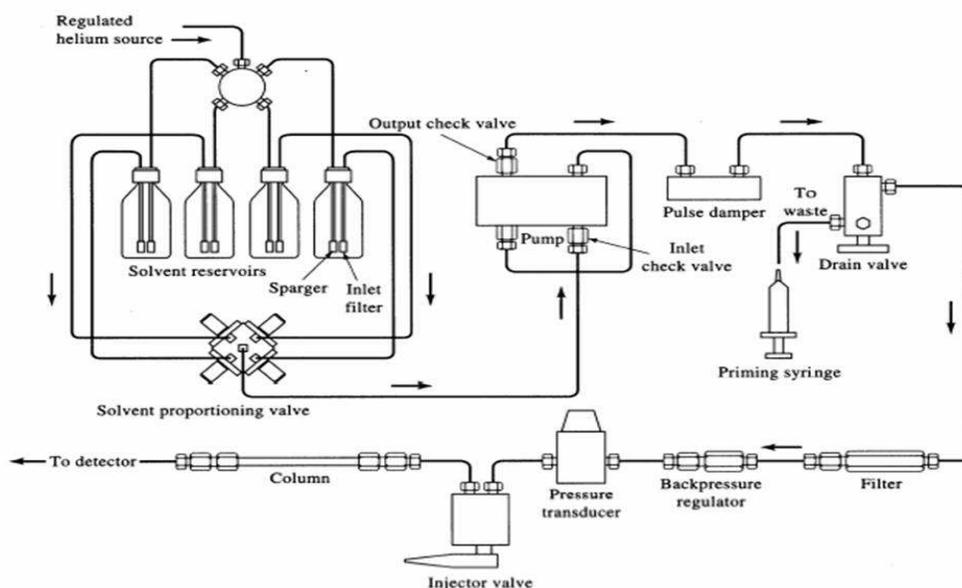
El método con OPA se utiliza específicamente con derivación precolumna para el análisis de aminoácidos, ya que es más sensible y tarda menos [tiempo](#) que otros [métodos](#) de cromatografía de líquidos <sup>[23], [26]</sup>. La reacción química que permite describir la formación del derivado del aminoácido isoleucina con el OPA se presenta en la figura 8.



**Figura 8.- Formación del derivado de la isoleucina (Ile) y el o-ftaldialdehído-ácido-2-mercaptoetanoico (OPA-2-MPA).**

## I.5.4 INSTRUMENTACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

Los componentes de un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se pueden observar detalladamente en la siguiente figura <sup>[27]</sup>:



**Figura 9.- Equipo de cromatografía de líquidos HPLC.**

### I.5.4.1 SISTEMAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA FASE MÓVIL

El equipo de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio o acero inoxidable, 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 columna y en los sistemas de detección, provocando ensanchamiento de bandas.

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

frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración de polvo y de las partículas sólidas en suspensión, con el fin de evitar que las mismas dañen la bomba y los sistemas de inyección.

#### **I.5.4.1.1 SISTEMA DE BOMBEO DE LA FASE MÓVIL**

Los sistemas de bombeo en HPLC emplean bombas para impulsar a la fase móvil, por lo general son rigurosos y deben cumplir los siguientes requisitos:

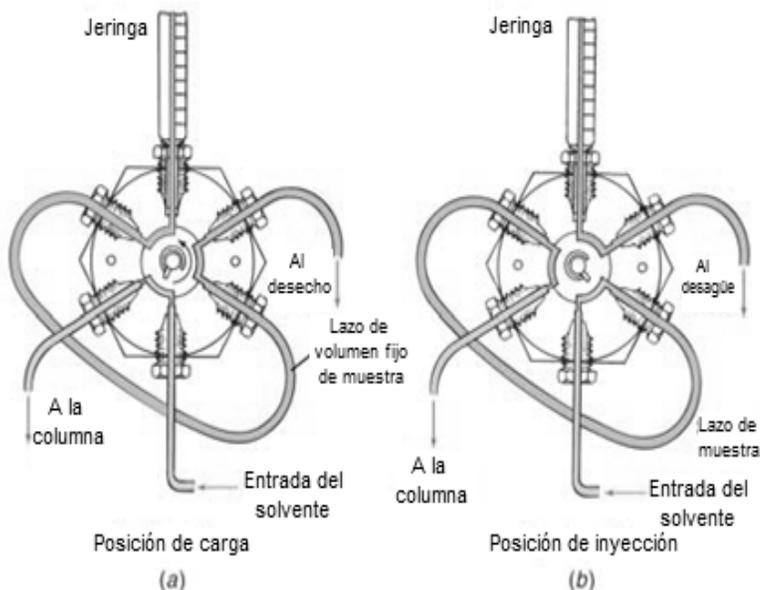
- La generación de presiones por encima de los 6000psi.
- Un flujo libre de pulsaciones, un intervalo de caudales de 0,1 a 10mL/min.
- Control y la reproducibilidad del caudal.
- Componentes resistentes a la corrosión.

Se utilizan tres tipos de bombas: recíprocas, de desplazamiento y neumáticas.

#### **I.5.4.2 SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRA**

Los inyectores son los encargados de introducir la muestra en la cabeza de la columna de forma reproducible y adecuada. Por lo general, se utilizan dos tipos de inyectores: el septum y la válvula de inyección con lazo o “loop” (**figura 10**).

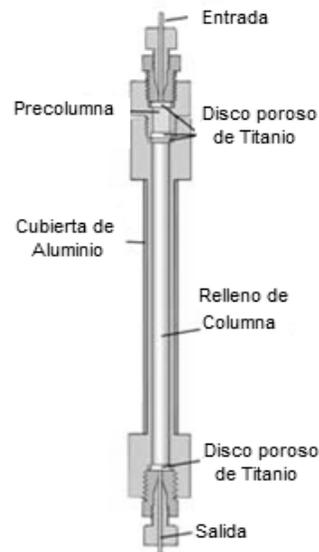
La inyección de la muestra es el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos. Por ello, los volúmenes de muestra que se emplean son muy pequeños, en el orden de microlitros. Además, es necesario que la muestra se filtre antes de introducirla a la columna, para evitar que partículas suspendidas en la solución puedan obturar la columna o dañar los sistemas de detección.



**Figura 10.- Loop de inyección de un sistema de HPLC.**

### I.5.4.3 COLUMNAS

Las columnas normalmente son de acero inoxidable ó de material polimérico, de diámetro interno uniforme. El diámetro interno de las columnas de escala analítica es de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10 micrones, con una longitud entre 5 y 30 cm (**figura 11**). Generalmente son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. En la mayoría de los casos, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca una precolumna que elimina los contaminantes de los disolventes, y los componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria. Los empaquetados más comunes son de partículas de sílice pero también se usa la alúmina, polímeros porosos y resinas de intercambio iónico.



**Figura 11.- Columna para cromatografía de líquidos HPLC.**

#### **I.5.4.4 DETECTORES**

Los detectores en cromatografía de líquidos pueden ser clasificados en dos tipos básicos.

1.-Detectores basados en una propiedad de la disolución. 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.

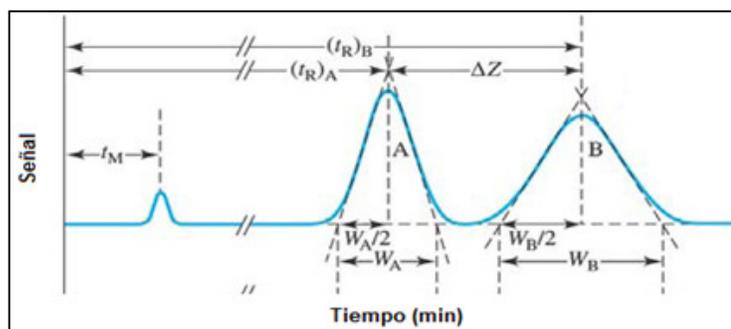
2.-Detectores basados en una propiedad del soluto. Responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia en el UV, fluorescencia o corriente límite, que no son inherentes a la fase móvil. Siendo de interés describir los detectores de UV-Visible

2.1.- 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 su intensidad. Para comparar las intensidades de los haces se usan detectores fotoeléctricos contrastados. También se utilizan detectores de arreglo de diodos (DADs) que permiten la recolección simultánea de cromatogramas (representación gráfica de la señal en función del tiempo) a diferentes longitudes de onda en una sola corrida. Una vez finalizada la corrida, se puede observar el espectro UV-visible en cualquiera de las longitudes de onda deseadas (por lo general entre 190nm y 400nm) a fin de confirmar la ventaja de la longitud de onda elegida.

#### I.5.4.5 ESTACIÓN DE TRABAJO

La señal del detector es enviada al integrador o estación de trabajo, el cual realiza un gráfico denominado cromatograma (**figura 12**), representación gráfica de la intensidad en función del tiempo. Idealmente se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. Además, calcula el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia.



**Figura 12.- Cromatograma de dos componentes.**

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

McGregor y Johnson, 1976 <sup>[34]</sup>. Determinaron algunos aminoácidos en orina por cromatografía de gases en 16 sujetos sanos y 48 con cáncer de próstata. Encontraron que el grupo de pacientes con la enfermedad excretó isoleucina (ILE) en la orina, aminoácido primario, mientras que en el grupo de sujetos sanos no se detectó la presencia del aminoácido. Los autores sugieren que la medición de los niveles de isoleucina en orina puede ser un indicador exitoso para la detección temprana del cáncer de próstata.

Phulwinder y colaboradores, 1995 <sup>[29]</sup>. Reportan los resultados preliminares del estudio de las secreciones prostáticas de individuos sanos, de sujetos con hiperplasia prostática y con cáncer próstata. En el estudio emplearon la técnica de electroforesis capilar. Los resultados indicaron que de las proteínas presentes en la orina, una no identificada que denominaron proteína "D", fue excretada principalmente por pacientes con cáncer de próstata, mientras que en sujetos sanos y con hiperplasia prostática, no se detectaron valores medibles. Estos resultados sugieren que esta proteína posee un gran potencial como marcador de cáncer de próstata. Los autores se proponen en estudios posteriores identificar esta proteína y continuar con este estudio.

Carducci y colaboradores, 1996 <sup>[25]</sup>. Determinaron aminoácidos primarios y secundarios en orina de 24 horas de recolección, por cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de fluorescencia. Las muestras de orina fueron sometidas a una reducción de disulfuros y derivación precolumna con o-ftaldialdehído-ácido-3-mercaptopropiónico (OPA-3-MPA) para los aminoácidos primarios y cloruro de 9-fluorenilmetilo (FMOC) para los secundarios. Luego de optimizar las condiciones, lograron la separación de 40 aminoácidos en 92 minutos. El método resultó sensible y fue aplicado para el diagnóstico de desórdenes genéticos y su relación con el

metabolismo de los aminoácidos. La curva de calibración fue lineal entre concentraciones de 10 a 400  $\mu\text{mol/L}$ . En el caso de la isoleucina, el valor de la concentración en orina de individuos sanos fue de 4,00  $\mu\text{mol/L}$  con una desviación estándar relativa (R.S.D) igual a 2,47 %.

Schwarz y colaboradores, 2005 <sup>[26]</sup>. Determinaron aminoácidos primarios y secundarios en muestras de plasma humano, utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa. Para la derivación de los aminoácidos primarios emplearon como reactivos de etiquetaje o-ftaldialdehído-ácido-3-mercaptopropiónico (OPA-3-MPA), siendo detectados por UV-Visible, en un detector con arreglo de diodos. Los aminoácidos secundarios se derivaron utilizando cloruro de 9-fluorenilmetilo (FMOC), y fueron detectados por fluorescencia. La separación cromatográfica se logro empleando dos gradientes de elución. Obtuvieron que este método es capaz de separar la isoleucina, en un rango de concentraciones de 34 a 121  $\mu\text{mol/L}$  con un R.S.D igual a 3,2 %, para sujetos normales, mientras que en un paciente con la enfermedad de jarabe de arce la concentración de isoleucina encontrada fue de 200  $\mu\text{mol/L}$ .

Gunjan y colaboradores, 2005 <sup>[30]</sup>. Determinaron la proteína apolipoproteína A-II (apoA-II), en muestras de plasma humano. Emplearon las técnicas de cromatografía líquida, electroforesis en gel y espectroscopía de masas, para aislar e identificar dicha proteína. Los resultados indicaron que la ApoA-II se encontraba específicamente en pacientes con cáncer de próstata. La capacidad de ApoA-II para detectar la enfermedad incluso en pacientes con niveles de antígeno prostático normales (0 - 4,0 ng / mL), sugiere la posible utilidad de esta proteína como marcador de cáncer de próstata.

Serkova y colaboradores, 2008 <sup>[24]</sup>. Determinaron metabolitos en secreciones prostáticas de pacientes con cáncer de próstata y sujetos sanos, empleando la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Entre los metabolitos medidos se encontraban el citrato ( $\text{CO}_2$  (COH)  $(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2$ )<sup>-3</sup>, la

espermina ( $^+N_{H3}-(CH_2)_3-^+NH_2-(CH_2)_4-^+NH_2-(CH_2)_3-^+NH_3$ ) y el myo-inositol ( $C_6H_6(OH)_6$ ), para los cuales se obtuvieron concentraciones de 2 a 3 veces inferiores en pacientes con cáncer de próstata, independientemente de la edad del sujeto. Los autores indican que estos analitos pueden ser marcadores potenciales de cáncer de próstata.

Sreekumar y colaboradores, 2009 <sup>[31]</sup>. Empleando como técnica de separación cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas (CG-MS), examinaron 1126 metabolitos en 260 muestras de sangre, orina y tejido prostático en individuos con próstata benigna, cáncer de próstata determinado clínicamente (a partir de los niveles de antígeno prostático específico o PSA), y con metástasis. Encontraron que 10 de estos metabolitos estaban presentes con mayor frecuencia en los casos del cáncer de próstata y en particular uno, la sarcosina, parece ser el mejor indicador. La sarcosina es un aminoácido y se encontró que el 79% de las muestras de pacientes con cáncer de próstata metastásico presentaban concentraciones del aminoácido, solo el 42% de las muestras de cáncer de próstata localizado clínicamente y en ninguna de las muestras de próstata benigna se encontraron niveles detectables del metabolito. Por lo tanto, existe una clara relación entre los niveles de sarcosina y el cáncer de próstata. El estudio también concluyó que la sarcosina es un mejor indicador del avance de la enfermedad en comparación con el antígeno prostático específico o PSA.

Nilsson y colaboradores, 2009 <sup>[32]</sup>. Analizaron microvesículas, llamadas exosomas, las cuales se encuentran en la orina de hombres que padecen cáncer de próstata, así como en individuos sanos. Observándose un particular incremento en el caso de individuos con cáncer. Los autores señalan que éstas, proceden directamente del tumor y permiten determinar cuáles genes están activos en cada caso de cáncer, lo que permitiría diferenciar entre tumores agresivos y latentes.

Hernández y colaboradores, 2010 <sup>[33]</sup>. Determinaron y compararon las concentraciones de isoleucina (ILE), en orina de pacientes con cáncer de próstata y

sujetos sanos. Para ello, utilizaron la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), con detección UV-visible y derivación precolumna con o-ftaldialdehído (OPA) -ácido tioglicólico. Analizaron 32 muestras de individuos mayores de 40 años, las cuales fueron divididas en cuatro grupos. Obtuvieron que el aminoácido ILE fue excretado por el 62,5 % de los pacientes a los cuales se realizó la biopsia prostática, obteniendo un rango de concentración de (559 – 1215)  $\mu\text{mol/L}$ , mientras que en los individuos sanos no fueron detectados niveles medibles del aminoácido.

A partir de la revisión bibliográfica realizada, en búsqueda de marcadores biológicos que faciliten el diagnóstico precoz del cáncer de próstata y permitan evitar procedimientos invasivos; se ha encontrado que se han utilizado diferentes moléculas para este propósito, entre ellas: citrato, espermina, myo-inositol, alanina, apolipoproteína, isoleucina y sarcosina. En este sentido es de interés estudiar el aminoácido isoleucina, cuyo método de detección y determinación en muestras de orina es relativamente asequible a los laboratorios clínicos especializados.

## **CAPÍTULO III**

### **OBJETIVOS**

En virtud de lo expuesto anteriormente y con el fin de determinar un biomarcador más específico para el diagnóstico precoz del cáncer de próstata, se plantearon los siguientes objetivos.

#### **III.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los niveles de isoleucina en orina como un potencial biomarcador de cáncer de próstata.

#### **III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Seleccionar tres grupos de individuos para el análisis de las muestras de orina. El primer grupo constituido por pacientes con cáncer de próstata clínicamente diagnosticado; un segundo grupo conformado por pacientes con un diagnóstico negativo para cáncer de próstata luego de la biopsia y deben realizársela nuevamente transcurrido seis meses para descartar falso negativo, el tercer grupo correspondiente al grupo control o individuos sanos.
- Determinar la concentración de isoleucina en las muestras de orina de los tres grupos en estudio.
- Analizar estadísticamente los resultados con la finalidad de establecer si existen diferencias significativas entre los tres grupos.
- Comparar los resultados obtenidos con los reportados en trabajos anteriores.

## CAPÍTULO IV

### PARTE EXPERIMENTAL

#### IV.1 INSTRUMENTACIÓN

Las medidas cromatográficas se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) Hewlett Packard modelo HP 1100 (Agilent Technologies), el cual se presenta en la figura 13. Este equipo está constituido por cinco módulos, los cuales se describen a continuación:

**A. Desgasificador.** Consiste en un sistema de purga provisto de un dispositivo que permite eliminar los gases presentes en la fase móvil. Sin embargo, es importante destacar que los solventes a ser utilizados deben ser desgasificados antes de ser introducidos en este módulo. Para ello, se filtran en un sistema a vacío y luego se someten a la acción de ultrasonido por 15 minutos.

**B. Bomba cuaternaria.** Permite modificar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Tiene la capacidad de suministrar cuatro tipos de solventes diferentes, además de proporcionar un flujo entre 0,1-5 mL/min y generar una presión máxima de 400 bar.

**C. Automuestreador.** El proceso de inyección es automatizado y está constituido por un lazo que posee una capacidad de 1-100  $\mu$ L y un contenedor de 100 portaviales.

**D. Sección de la columna.** Este módulo se encuentra termostatzado por efecto Peltier, con temperaturas que van desde -5 °C hasta 80 °C, además de poseer tres compartimientos que permiten colocar varias columnas a la vez.

Para este estudio se utilizó una columna WATERS, Symmetry ® C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m. (4,6 x 250 mm).

**E.** Detector UV-visible de onda variable. Es un detector espectrofotométrico UV-visible Hewlett Packard Serie 1100, el cual permite trabajar a una sola longitud de onda por corrida.

La data generada se procesó empleando el software de cromatografía HP ChemStation Versión 1997.



**Figura 13.- Equipo de cromatografía de líquida de alta eficiencia (HPLC) Hewlett Packard HP 1100 (Agilent Technologies)**

## IV.2 MATERIALES

Se empleó material volumétrico clase A (pipetas graduadas y balones aforados), micro pipetas, y colectores de muestras de orina. Todo el material fue rigurosamente lavado antes de ser utilizado.

## IV.3 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).

### VI.3.1 FASE MÓVIL

Para la separación cromatográfica se emplearon las siguientes disoluciones:

**S<sub>A</sub>**: Solución buffer de acetato de sodio (AnalaR) 60 mM / ácido acético (RIEDEL-DE-HAËN) (pH= 6,86).

**S<sub>B</sub>**: Mezcla acetonitrilo (Sigma-Aldrich), buffer de acetato de sodio 100 mM / ácido acético (pH= 5,45) y metanol (Sigma-Aldrich) en una relación 74.5:21.0:4.5(v/v/v) <sup>[26]</sup>.

### IV.3.2 SOLUCIONES PATRÓN

Los patrones de isoleucina (Biochemical) para la curva de calibración se prepararon a partir de diluciones sucesivas de una solución madre de concentración  $(2036 \pm 8) \mu\text{mol/L}$ . Para ello, se disolvió  $(0,0267 \pm 0,0001)$  g del aminoácido al 99% en una solución buffer de borato pH= 10,00 (Merck) y se enrazó a un volumen de 100 mL.

#### IV.4 DERIVACIÓN DE LA ISOLEUCINA

Para la detección de la isoleucina se utilizó como reactivo de etiquetaje o-ftaldialdehído (OPA) a una concentración de  $20,16 \pm 0,04$  mg/mL, el cual se preparó disolviendo ( $20,16 \pm 0,0001$ ) g del reactivo, en metanol al 10%v/v y ácido mercaptoetanóico al 2%v/v en una solución buffer de borato pH= 10,00 (Merck) <sup>[25]</sup>.

#### IV.5 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de orina fueron donadas por pacientes voluntarios del servicio de Urología del Hospital Universitario de Caracas (HUC) de la Universidad Central de Venezuela (UCV). La muestra se tomó a los pacientes antes de realizarse la biopsia prostática. Se recolectaron en envases de plásticos para orina. Las muestras fueron divididas en tres grupos.

**Grupo 1.-** Pacientes con diagnóstico de cáncer, después de realizarse la biopsia.

**Grupo 2.-** Pacientes con diagnóstico negativo para cáncer en el resultado de la biopsia, y deben realizarse la biopsia nuevamente en seis meses para descartar falso negativo.

**Grupo 3.-** Pacientes sin cáncer (Grupo control).

Las muestras que conforman el grupo control o individuos sanos (valores de PSA menores a 4 ng/mL y que al realizar el tacto rectal no se consideró realizar biopsia prostática), fueron recolectadas en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, con previa autorización de cada uno de los individuos donadores (ver anexo 1 en el apéndice).

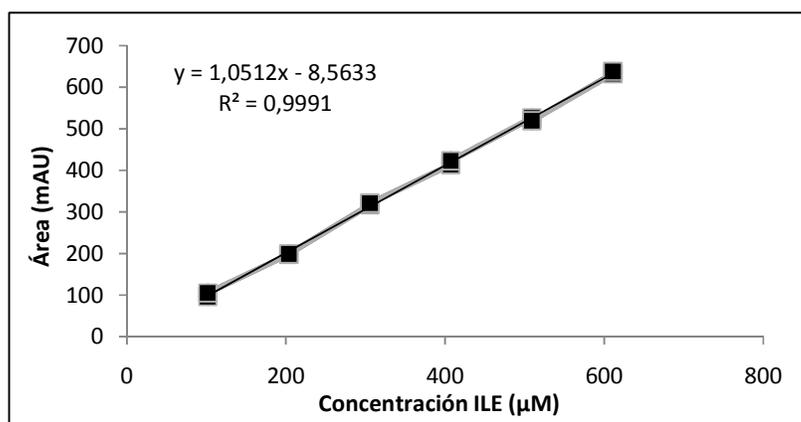
Todas las muestras fueron refrigeradas a una temperatura de  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis. Los resultados de las biopsias prostáticas fueron facilitados por el Instituto Anatomopatológico “Dr. José A. O’Daly” de la Universidad Central de Venezuela (IAP-UCV).

#### IV.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ISOLEUCINA (ILE)

La determinación de la concentración de isoleucina en las muestra de orina se realizó por el método de calibración directa. En la tabla 6 se presentan las concentraciones de las soluciones patrón utilizadas en la construcción de la curva de calibración (ver figura 14).

**Tabla 6.- Patrones de isoleucina.**

Patrón	Concentración ( $\mu\text{mol/L}$ )
1	$101,8 \pm 0,4$
2	$203,6 \pm 0,8$
3	$305,4 \pm 1,0$
4	$407,2 \pm 2,0$
5	$509,0 \pm 2,0$
6	$610,8 \pm 2,0$



**Figura 14.- Curva de calibración para la determinación de ILE.**

Las condiciones utilizadas inicialmente para la separación de la isoleucina (ILE) <sup>[33]</sup>, se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7.- Condiciones cromatográficas para la separación de ILE.**

Tiempo (min)	S <sub>A</sub> /S <sub>B</sub> (%)	Flujo (mL/min)	λ (nm)	V <sub>iny.</sub> (μL)	T (°C)
6	78/22	1,0	338	3	40
9	95/5	1,0			

**S<sub>A</sub>**: Solución buffer de acetato de sodio 60 mM / ácido acético (pH= 6,86).

**S<sub>B</sub>**: Mezcla acetonitrilo, buffer de acetato de sodio 100 mM / ácido acético (pH= 5,45) y metanol (74.5:21.0:4.5).

Con la finalidad de evaluar las condiciones anteriormente señaladas para la separación de ILE, se inyectaron patrones utilizando el sistema de inyección con programación, como se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8.- Programación de inyección.**

Función	Cantidad	Vial	Reactivo
Draw	10-60 μL	2	ILE de 2036 μM
Eject	10 μL	1*	ILE de 2036 μM
Draw	90-40 μL	3	Buffer de borato
Eject	90 μL	1*	Buffer de borato
Draw	100 μL	4	OPA-2MPA
Eject	100 μL	1*	OPA-2MPA
Wait	0,5 min	-	-
Draw	3 μL	1*	Derivado de ILE
Inyect	-	-	-

\*Vial destinado para la formación del derivado ILE.

Draw: Tomar, Eject: Eyectar, Wait: Esperar, Inyect: Inyectar.

Las alícuotas de ILE y el volumen de solución buffer varían dependiendo de la concentración del patrón, considerando un volumen de 100 μL de disolución y un

volumen total de 200  $\mu\text{L}$ . El volumen de OPA-2MPA para formar el derivado, se mantuvo constante.

Una vez realizadas varias corridas bajo las condiciones para la separación de ILE, a excepción de la temperatura (no funcionaba el termóstato de la sección de la columna), no se observó la elución del pico correspondiente, por lo tanto fue necesario optimizar algunas condiciones experimentales. Inicialmente, se modificó la composición de los eluentes. Las composiciones de las fases móviles ensayadas se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9.- Programas de elución para la detección de ILE.**

Programa de elución	Tiempo (min)	S <sub>A</sub> /S <sub>B</sub> (%)
Isocrática	-	78/22
Isocrática	-	95/5
Gradiente Lineal	6	78/22
	9	85/15

S<sub>A</sub>: Solución buffer de acetato de sodio 60 mM / ácido acético (pH= 6,86).

S<sub>B</sub>: Mezcla acetonitrilo, buffer de acetato de sodio 100 mM / ácido acético (pH= 5,45) y metanol (74.5:21.0:4.5, v/v/v).

Se modificó el volumen de muestra a inyectar respecto al recomendado (3  $\mu\text{L}$ ) seleccionados fueron 10 y 25  $\mu\text{L}$ .

El flujo de la fase móvil también se modificó a 0,8 y 1,2 mL/min, con el fin de determinar la condición de flujo óptimo para la separación del aminoácido.

#### IV.7 IDENTIFICACIÓN DE LA ISOLEUCINA

La identificación del pico de isoleucina en la orina se realizó enriqueciendo una muestra. Para ello, se mezcló 50  $\mu\text{L}$  de la orina, 50  $\mu\text{L}$  de solución de ILE de concentración 2036  $\mu\text{mol/L}$  y 100  $\mu\text{L}$  de la solución de OPA-2MPA. Para la muestra

no enriquecida se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de la orina con 100  $\mu\text{L}$  de OPA-2MPA, observándose la saturación en la señal del equipo, por lo cual se diluyó la muestra empleando la solución buffer de borato  $\text{pH}=10$ , para ello se tomaron 75  $\mu\text{L}$  de orina, 25  $\mu\text{L}$  de la solución buffer y 100  $\mu\text{L}$  de OPA-2MPA.

#### **IV.8 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE ORINA**

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la determinación de la concentración de isoleucina en orina, las muestras fueron filtradas con filtros de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro. Para ello, se mezcló 75  $\mu\text{L}$  de orina, 25  $\mu\text{L}$  de solución buffer y 100  $\mu\text{L}$  de OPA-2MPA, utilizando el programa de inyección del automuestreador señalado en la tabla 8. Cada muestra se analizó por duplicado.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

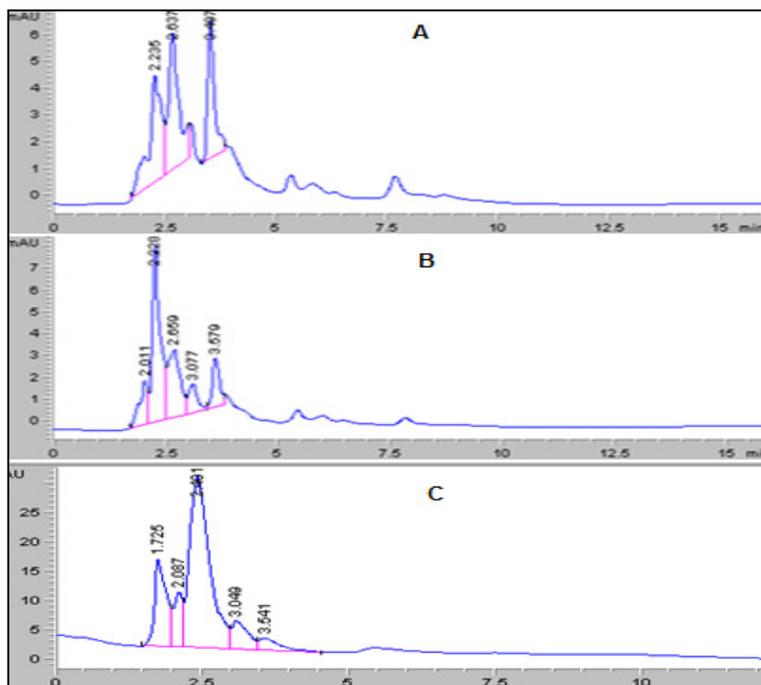
La determinación de los niveles de isoleucina (ILE) en las muestras de orina, se inició empleando las condiciones cromatográficas reportadas por Hernández <sup>[33]</sup>, a excepción de la variable temperatura, ya que para este estudio el horno de la sección de la columna no funcionaba (véase tabla 7, capítulo IV). Con el fin de evaluar la separación de ILE bajo esas condiciones, se realizaron experiencias utilizando soluciones patrón de concentración conocida. Sin embargo, no se observó la elución del pico de interés. Esto posiblemente se debe a que se trabajó a temperatura ambiente. Por esta razón se decidió optimizar los demás parámetros experimentales, tales como: la composición de la fase móvil, el volumen de inyección y el flujo de la fase móvil.

#### V.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

##### V.1.1 COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL

Se modificó la composición de la fase móvil con el propósito de determinar el efecto sobre la elución de la isoleucina (ILE). El análisis se inició en modo isocrático, los resultados se presentan en las figura 14 (cromatogramas A y B), en los cuales se puede observar que no se registró la señal correspondiente a ILE. En consecuencia, se decidió ensayar un régimen por gradiente de elución de 78/22 a 85/15 en proporción v/v para la relación de las disoluciones  $S_A/S_B$  (cromatograma C) para minimizar la retención del analito y mejorar la eficiencia de la separación. Sin embargo, con esta programación no se logró separar el aminoácido, por lo tanto no se consideró necesario variar las composiciones de fase móvil planteadas inicialmente para este estudio, reportadas por Carducci <sup>[25]</sup> y Hernández <sup>[33]</sup>.

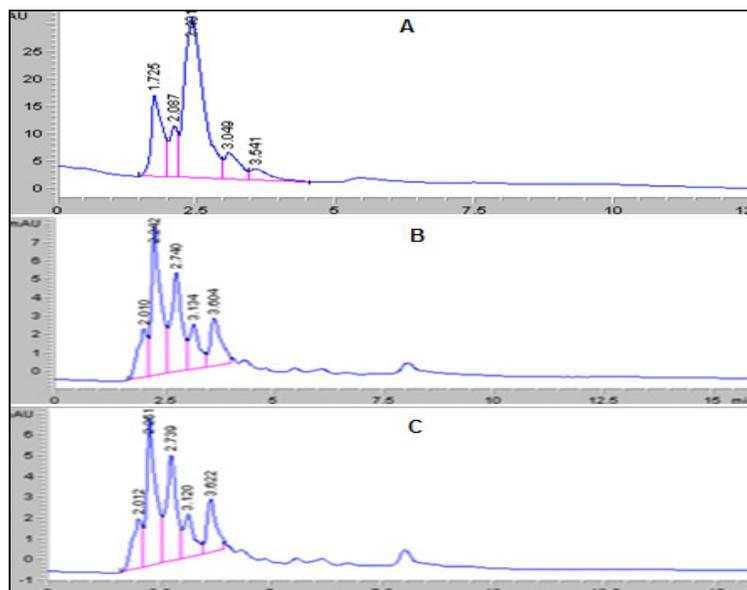
Los cromatogramas correspondientes a las composiciones de fase móvil empleadas se muestran en la figura 14.



**Figura 15.- Programación isocrática (A) 78/22 v/v  $S_A/S_B$ , (B) 95/5 v/v  $S_A/S_B$   
Programación con gradiente (C) 78/22 a 85/15 v/v  $S_A/S_B$ .**

### V.1.2 VOLUMEN DE INYECCIÓN DE LA MUESTRA

El volumen de inyección se varió con la finalidad de maximizar la sensibilidad del análisis, los resultados se observan en la figura 15. En general, no se observaron diferencias en la señal al inyectar 3, 10 y 25  $\mu\text{l}$ , ya que el pico correspondiente a ILE no eluyó. Para los componentes de la matriz la señal aumentó en función del volumen de inyección.

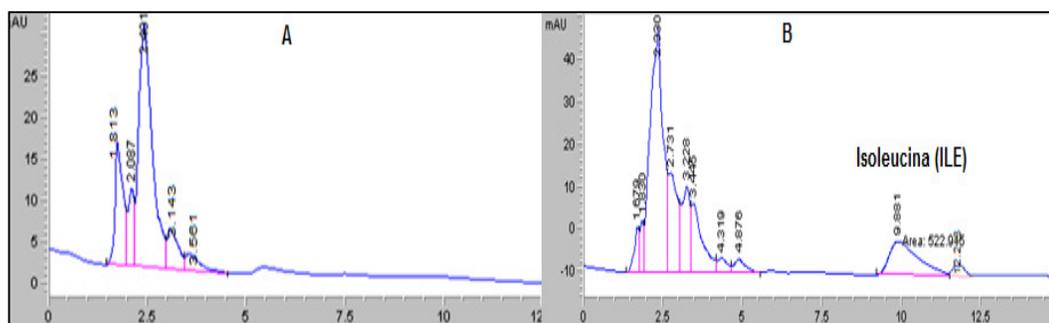


**Figura 16.- Volumen de inyección de ILE (A) 25 µL, (B) 10 µL, (C) 3 µL.**

Durante el análisis no se inyectaron volúmenes mayores de muestra, al considerar que podría afectar la asimetría y ensanchamiento del pico, produciendo en consecuencia, pérdida de resolución, como señala la bibliografía <sup>[35]</sup>.

### V.1.3 FLUJO DE FASE MÓVIL

Debido a que el flujo de fase móvil influye en el proceso de separación, se seleccionó modificar esta variable con el fin de lograr la separación de ILE. En la figura 17 se observan los resultados de esta experiencia. Inicialmente, se trabajó con un flujo de 0,8 ml/min, obteniendo un aumento considerable en el tiempo de análisis, sin producirse la elución de ILE. Por el contrario, a un flujo de 1,2 ml/min se logró la separación satisfactoria del aminoácido, lo cual se evaluó a partir del valor de resolución ( $R_S$ ) de los picos adyacentes, obteniéndose un valor de  $R_S = 5,93 > 1,5$ , que indica que los picos están separados. El factor de asimetría ( $A_S$ ) calculado fue de 0,81, lo cual indica que el pico no es completamente simétrico, sin embargo se acepta trabajar bajo estas condiciones, ya que el valor de  $A_S$  es próximo a 1,0, correspondiente al valor de  $A_S$  para un pico simétrico.



**Figura 17.- Flujo de fase móvil (A) 0,8 mL/min, (B) 1,2 mL/min.**

Luego de modificar las condiciones experimentales para la separación de ILE, es importante destacar que en el análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), la temperatura es una variable importante a considerar, ya que es posible que ejerza un efecto determinante sobre la separación, al evitar que el aminoácido sea retenido irreversiblemente por la fase estacionaria y aumentar su velocidad de difusión a lo largo del sistema cromatográfico. Para este estudio no se disponía de la variable temperatura, de modo que la separación se logró optimizando el flujo de fase móvil, como ya se señaló. En este sentido, se determinó la condición de compromiso en la cual el flujo y la eficiencia de la columna eran óptimos para la separación. En la tabla 10 se señalan las condiciones óptimas para la separación del aminoácido ILE a temperatura ambiente.

**Tabla 10.- Condiciones cromatográficas optimizadas para el análisis de ILE.**

Tiempo (min)	S <sub>A</sub> /S <sub>B</sub> (%)	Flujo (mL/min)	λ (nm)	V <sub>iny.</sub> (μL)	T (°C)
6	78/22	1,2	338	3	25
9	95/5	1,2			

**S<sub>A</sub>**: Solución buffer de acetato de sodio 60 mM / ácido acético (pH= 6,86).

**S<sub>B</sub>**: Mezcla acetonitrilo, buffer de acetato de sodio 100 mM / ácido acético (pH= 5,45) y metanol (74.5:21.0:4.5).

### V.1.4 IDENTIFICACIÓN DE LA ISOLEUCINA EN ORINA

La identificación del pico de isoleucina en la orina se realizó comparando el área y altura de pico de una muestra antes y después del enriquecimiento con un patrón de isoleucina. En la figura 18 se presentan los cromatogramas correspondientes. (A) Muestra no enriquecida y (B) Muestra enriquecida con una cantidad conocida de ILE. Los valores de área, altura y tiempo de retención se muestran en la tabla 11, observándose que el área y altura de pico incrementaron considerablemente en la muestra enriquecida con ILE.

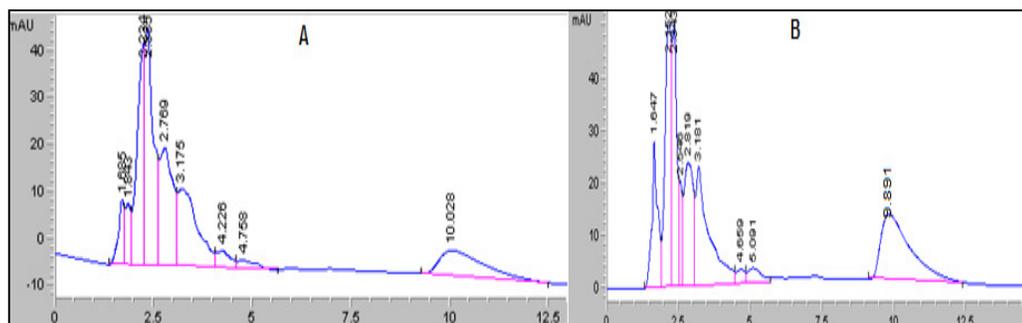


Figura 18.- (A) Muestra no enriquecida, (B) Muestra enriquecida.

Tabla 11.- Áreas, alturas y tiempos de retención para la identificación del pico de isoleucina (ILE).

Muestra	Área (mAU)	Altura (mAU)	$t_R$ (min)
Sin isoleucina	530,2	5,4	10,03
Con Isoleucina	724,0	12,6	9,89

### V.2 FIGURAS DE MERITO

### V.2.1 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección y de cuantificación se estimó a partir del método señalado en el Miller <sup>[36]</sup>, se determinó por extrapolación de la curva de calibración ( $y = 1,0512x - 8,5613$ ), los valores obtenidos muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.- Figuras de merito para el método.**

Límite de detección (LOD) ( $\mu\text{mol/L}$ )	Limite de cuantificación (LOQ) ( $\mu\text{mol/L}$ )
17	57

### V.2.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Con la finalidad de determinar la exactitud del método, se calculó el porcentaje de recuperación para una de las muestras de orina. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos, observándose que el valor para el porcentaje de recuperación se encuentra dentro de los límites establecidos para muestras biológicas, cuyos valores están entre 80 y 120% <sup>[37]</sup>.

**Tabla 13.- Porcentaje de recuperación para la determinación de ILE en orina.**

$[\text{ILE}]_{\text{Muestra}} \mu\text{mol/L}$	$[\text{ILE}]_{\text{Patrón}} \mu\text{mol/L}$	$[\text{ILE}]_{\text{Muestra Enriquecida}} \mu\text{mol/L}$	% Recuperación
$1367 \pm 4$	$509 \pm 2$	$1858 \pm 4$	$97 \pm 1$

La precisión del método se evaluó midiendo por triplicado la misma orina. Los cromatogramas correspondientes se presentan en la figura 18 y los resultados en la tabla 14.

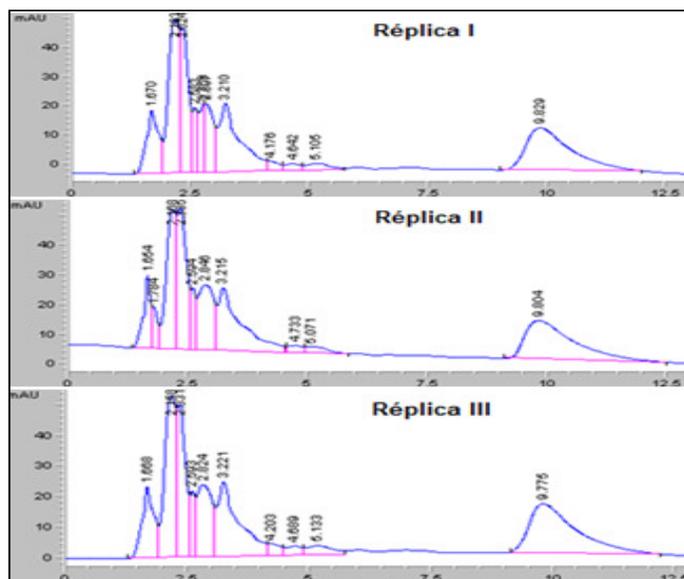


Figura 19.- Muestra de orina para la determinación de la precisión del método.

Tabla 14.- Parámetros para la determinación de la precisión.

Nº Réplicas	[ILE] ( $\mu\text{mol/L}$ )	Área (mAU)	$t_R$ (min)
1	1540	577,7	9,83
2	1542	578,3	9,80
3	1497	582,1	9,78
Promedio	<b>1526 <math>\pm</math> 25</b>	<b>579 <math>\pm</math> 3</b>	<b>9,8 <math>\pm</math> 0,03</b>
% RSD	<b>1,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>

De acuerdo con estos resultados, se puede decir que la reproducibilidad estimada como desviación estándar relativa (%RSD) <sup>[38]</sup> para la determinación de ILE en orina, se considera aceptable al ser menor que el 5 - 10%.

### V.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ISOLEUCINA

### V.3.1 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ORINA

Una vez establecidas las condiciones para la determinación de Ile, presentadas en la tabla 10, se procedió a realizar el análisis de las muestras de orina de los grupos de pacientes en estudio. En la tabla 15 se muestran los resultados de área y tiempo de retención de los patrones empleados para la elaboración de la curva de calibración. Los cromatogramas de los patrones se presentan en el **anexo 5** del apéndice.

**Tabla 15.- Áreas, alturas y tiempos de retención de los patrones de isoleucina.**

Patrón	[ILE] ( $\mu\text{mol/L}$ )	Réplica	$t_R$ (min)	Área (mAU)
1	101,8 $\pm$ 0,4	1	10,80	96,7
		2	10,73	105,3
2	203,6 $\pm$ 0,8	1	10,79	198,2
		2	10,80	198,9
3	305,4 $\pm$ 1,0	1	10,88	317,4
		2	10,81	321,2
4	407,2 $\pm$ 2,0	1	10,74	413,6
		2	10,88	423,1
5	509,0 $\pm$ 2,0	1	10,69	526,4
		2	10,75	519,7
6	610,8 $\pm$ 2,0	1	10,69	632,8
		2	10,40	638,3

En la tabla 16 se presenta la ecuación de la curva de calibración para la determinación de la concentración de ILE. El coeficiente de correlación  $r^2$  indica que la concentración de los patrones y la señal presentan una buena correlación lineal.

**Tabla 16.- Ecuación de la curva de calibración para la determinación de Isoleucina (ILE) en las muestras.**

Rango [ILE] ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ecuación de la recta	Coefficiente de regresión ( $R^2$ )
101,8 – 610,8	$y = 1,0512x - 8,5633$	0,9991

Se analizaron treinta y cinco (35) muestras de orina de individuos de diferentes edades, los cuales se clasificaron en los grupos de estudio correspondientes de acuerdo con el resultado indicado en el informe de biopsia, obteniendo: once (11) pacientes con cáncer (Grupo 1), diecisiete (17) pacientes sin cáncer y que pueden presentar alguna patología en la próstata (hiperplasia prostática o prostatitis), por lo cual se deben realizar una nueva biopsia en un período de seis meses (Grupo 2) y siete (7) individuos sanos o grupo control (Grupo 3). En las figuras 20 y 21 se muestran los cromatogramas correspondientes al análisis de una muestra de orina con valor de concentración de ILE mayor y menor al límite de detección (LOD), respectivamente. Los demás cromatogramas de las muestras analizadas se presentan en los **anexos 6,7 y 8** del apéndice. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

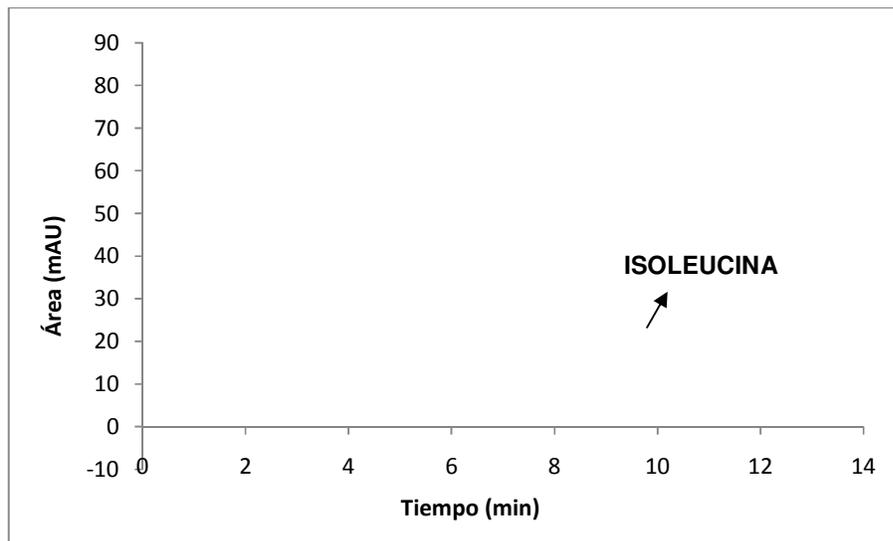


Figura 20.- Muestra con concentración de ILE mayor a 17  $\mu\text{mol/L}$  (LOD).

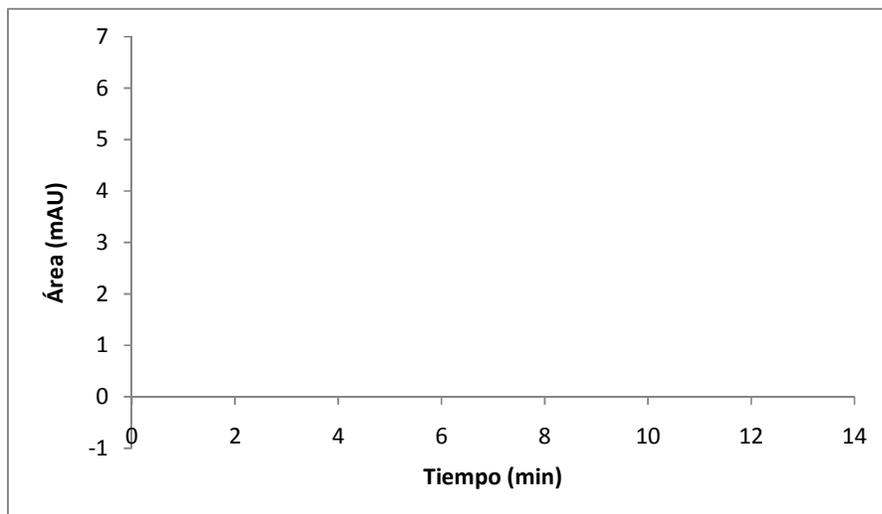


Figura 21.- Muestra con concentración de ILE menor a 17  $\mu\text{mol/L}$  (LOD).

En las tablas 17 y 18 se presentan los resultados obtenidos para los grupos de pacientes a los que se realizó la biopsia prostática (véase anexo 4 del apéndice para el cálculo de la concentración de isoleucina en las muestras de orina).

**Tabla 17.- Concentraciones de isoleucina para el grupo de pacientes con diagnóstico positivo para cáncer de próstata (Grupo 1).**

Nº Muestra	Edad (Años)	Nº Réplica	t <sub>Retención</sub> (min)	Área (mAU)	[ILE] <sub>Promedio</sub> µM
13	73	1	10,22	195,5	538 ± 20
		2	10,16	211,2	
39	67	1	10,04	397,6	977 ± 53
		2	10,08	355,7	
50	59	1	9,9	583,4	1410 ± 92
		2	10,01	511,5	
59	77	1	10,29	215,1	563 ± 4
		2	10,14	211,9	
45	72	1	9,96	510,5	1332 ± 16
		2	9,88	522,9	

53	72	1	9,95	598,7	1541 ± 1
		2	9,97	599,3	
22	63	1	10,65	227	679 ± 81
		2	10,56	291	
31	62	1	10,20	412,1	1061 ± 7
		2	10,10	407,1	
33	80	1	10,11	219,2	573 ± 5
		2	10,10	215,3	
21	70	1	-	-	<17
		2	-	-	
32	65	1	-	-	<17
		2	-	-	

LOD= 17 µmol/L.

**Tabla 18.- Concentraciones de isoleucina para el grupo de pacientes con diagnóstico negativo para cáncer de próstata (Grupo 2).**

Nº Muestra	Edad (Años)	Nº Réplica	t <sub>Retención</sub> (min)	Área (mAU)	[ILE] <sub>Promedio</sub> μmol/L
36	71	1	10,15	350,9	894 ± 18
		2	10,18	337,2	
56	61	1	10,31	214,5	548 ± 18
		2	10,3	200,3	
63	66	1	10,39	341,4	887 ± 1
		2	10,29	341	
44	71	1	10,89	351,4	896 ± 17
		2	10,98	338	
35	56	1	10,28	165,6	424 ± 18
		2	10,30	151,7	
61	53	1	9,86	515,2	1337 ± 8
		2	9,95	521,7	
10	69	1	9,92	472,7	1164 ± 57
		2	10,03	427,8	
1	77	1	-	-	<17
		2	-	-	

5	76	1	-	-	<17
		2	-	-	
9	60	1	-	-	<17
		2	-	-	
16	68	1	-	-	<17
		2	-	-	
18	56	1	-	-	<17
		2	-	-	
28	57	1	-	-	<17
		2	-	-	
43	74	1	-	-	<17
		2	-	-	
47	50	1	-	-	<17
		2	-	-	
49	60	1	-	-	<17
		2	-	-	
66	73	1	-	-	<17
		2	-	-	

LOD= 17  $\mu$ mol.

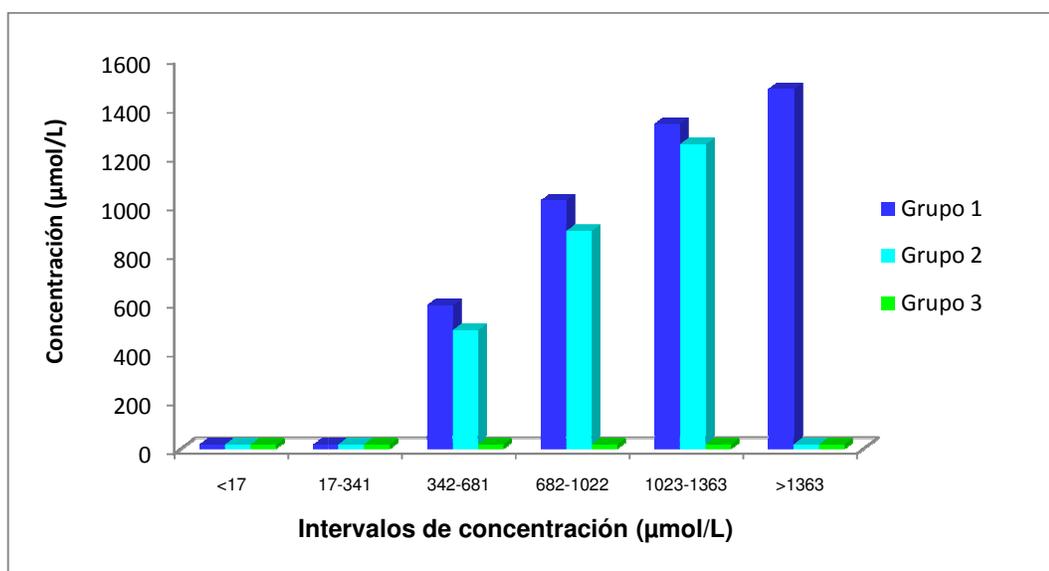
En la tabla 19 se indican los resultados correspondientes al grupo de individuos sanos.

**Tabla 19.- Grupo control o individuos sanos.**

Nº Muestra	Edad (Años)	[ILE] $\mu\text{M}$
12	71	<17
10	56	<17
9	47	<17
8	47	<17
7	50	<17
5	43	<17
4	48	<17

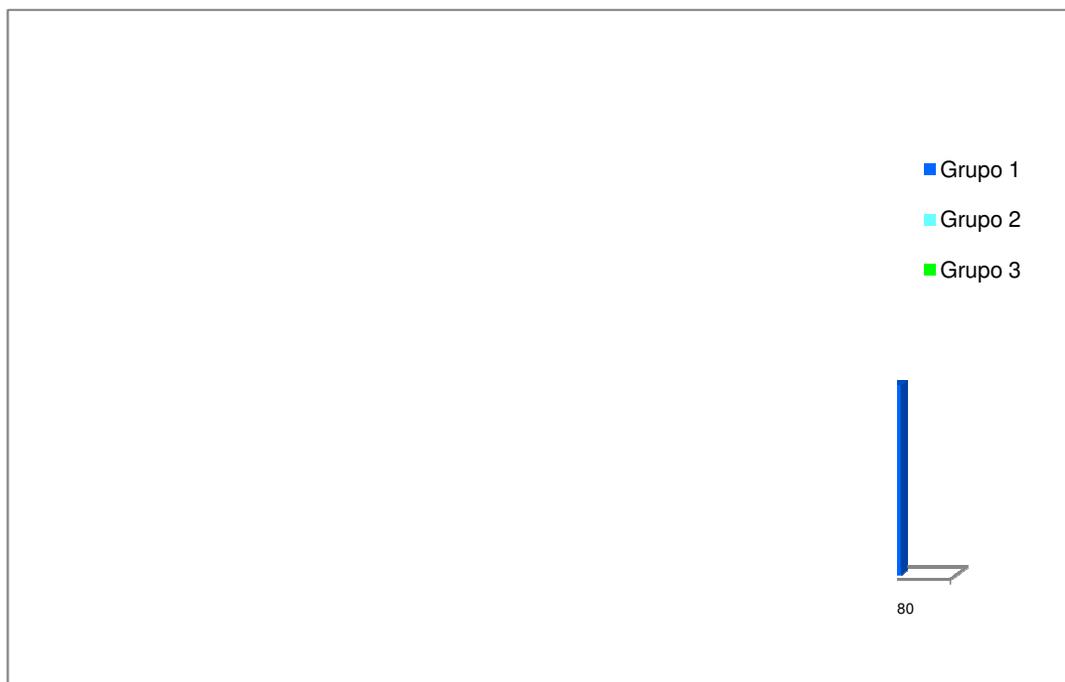
LOD= 17  $\mu\text{mol/L}$ .

En el gráfico por intervalos de concentración que se aprecia en la figura 22, se puede observar que sólo los grupos de pacientes 1 y 2 presentan isoleucina en la orina, lo cual evidencia que los niveles del aminoácido se encuentran relacionados con patologías en la próstata. Sin embargo, no permite diferenciar entre patologías benignas (hiperplasia prostática y prostatitis) y malignas (carcinoma). Además, estos resultados indican que el grupo de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata presentan concentraciones de isoleucina mayores que los pacientes con patologías en la próstata diferentes al cáncer, siendo de interés destacar que a partir de 1363  $\mu\text{M}$ , no se reportaron niveles de ILE para el grupo 2.



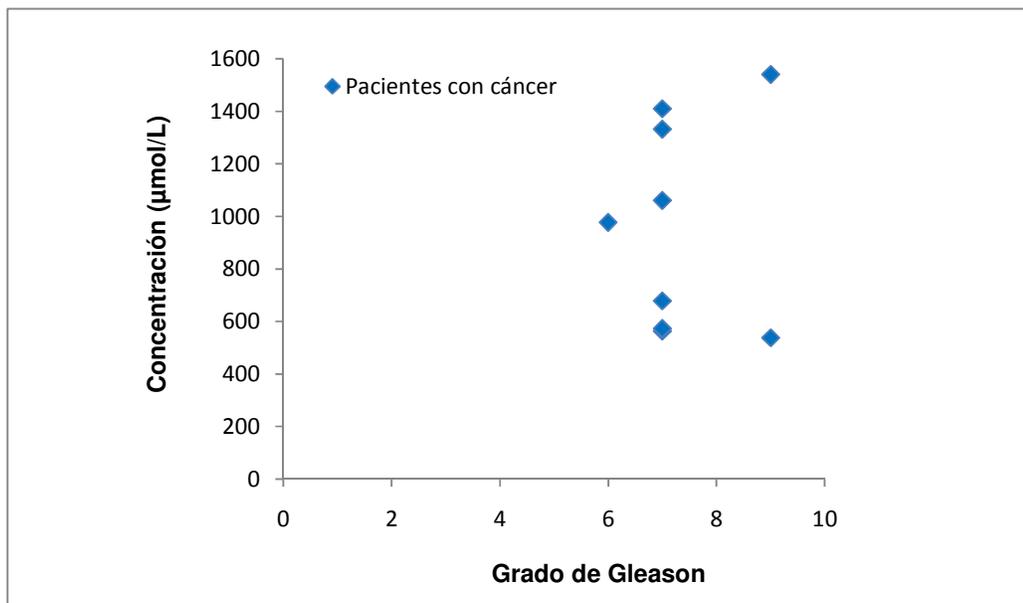
**Figura 22.- Distribución por intervalos de concentración de ILE.**

Con la finalidad de evaluar la relación entre la concentración del aminoácido y el cáncer de próstata, se realizó un análisis mediante gráficos de distribución. En la figura 23 se representa gráficamente las concentraciones de ILE respecto a la edad de los individuos de los grupos estudiados, observándose que no existe una correlación entre la concentración de ILE y la edad del individuo, lo cual coincide con lo reportado por Hernández <sup>[33]</sup>.



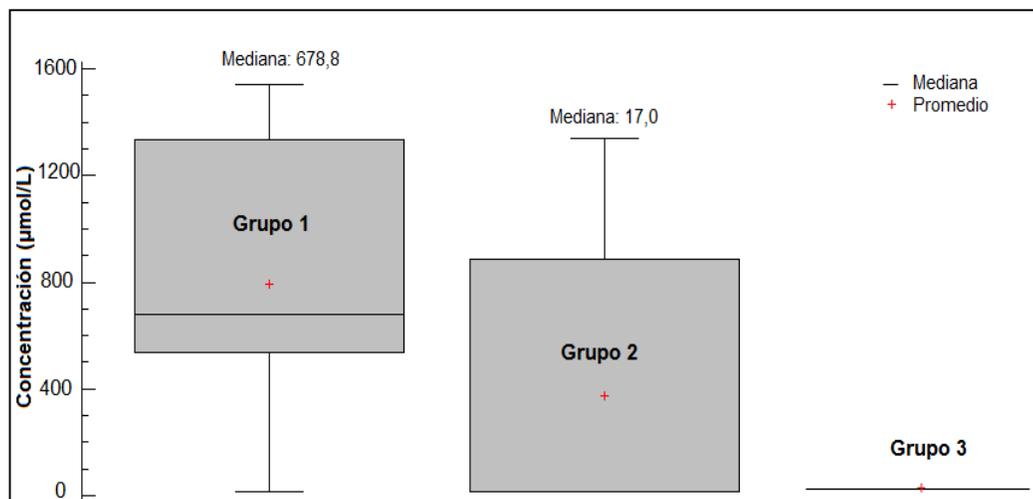
**Figura 23.- Concentración de ILE en relación con la edad de los individuos.**

El grado de Gleason se utiliza para determinar el grado de malignidad histológica del carcinoma prostático y se refleja en forma de la suma de dos puntuaciones que oscilan de 1 a 5, desde un adenocarcinoma tubular bien diferenciado, de crecimiento expansivo hasta uno muy poco diferenciado e infiltrante, respectivamente (por ejemplo, suma de Gleason 3 + 4 = 7). Las sumas totales de 2 a 4 se consideran bajas, indicando que se trata de tumor de crecimiento lento, de 5 a 6 se consideran intermedias, representando el grado intermedio de agresividad. Las sumas de 7 a 10 se consideran elevadas y suelen indicar que el tumor es agresivo, y de mal pronóstico <sup>[39], [40]</sup>. Con la finalidad de determinar si existe alguna relación entre las concentraciones de isoleucina del grupo de pacientes diagnosticado con cáncer y el grado de Gleason, se graficó ésta en función del grado de Gleason reportado en el informe de biopsia (ver anexo 2), los resultados se muestran en la figura 24, en el cual se observa que no existe correlación entre la concentración de ILE y el grado de Gleason del tumor.



**Figura 24.- Concentración de ILE con respecto al grado de Gleason.**

Para comparar las concentraciones de ILE en los tres grupos de pacientes y evaluar la distribución de los datos para determinar si existían diferencias significativas, se aplicó el programa STATGRAPHICS 5.1. Los diagramas de cajas y bigotes se muestran en la figura 25, obteniéndose que las concentraciones de isoleucina no presentan una distribución normal en los grupos de estudio. Del mismo modo, se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza en las medianas de los grupos, según el análisis de las varianzas ( $p=0,0039 < 0,05$ , para la prueba f).



**Figura 25.- Diagrama de caja y bigotes de los grupos en estudio.**

En la tabla 20 se indican los rangos de las concentraciones de isoleucina para los tres grupos.

**Tabla 20.- Rango de concentraciones de isoleucina [ILE] para los grupos en estudio.**

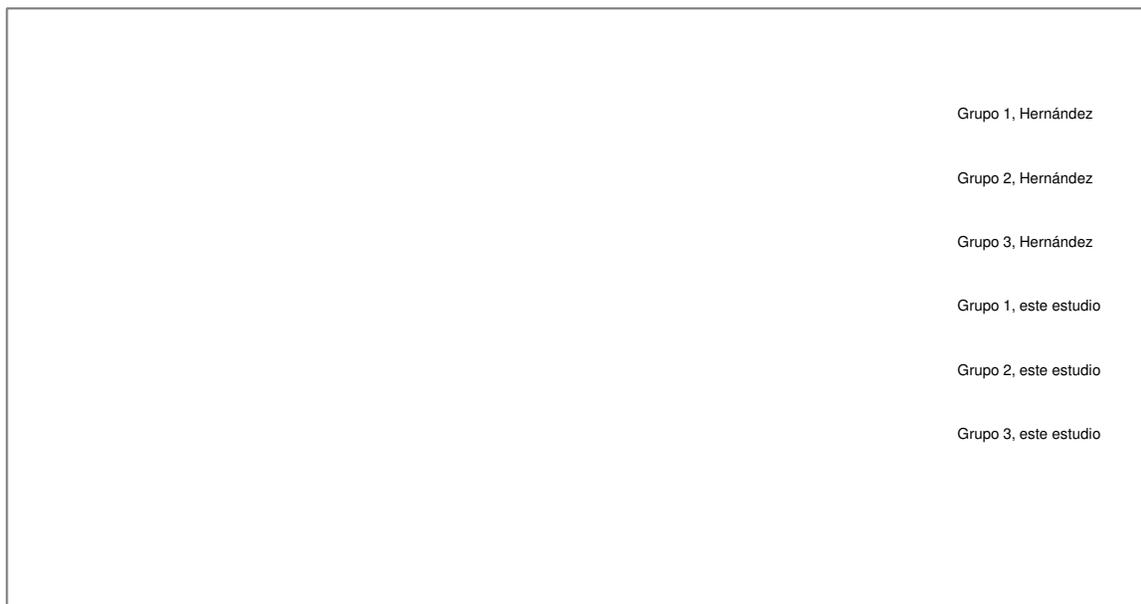
GRUPO	Nº TOTAL DE PACIENTES	RANGO [ILE] (µM)	% [ILE]
Pacientes con cáncer	11	(17 – 1541)	81,8
Pacientes con diagnóstico negativo para cáncer	17	(17 – 1337)	41,2
Grupo Control	7	< 17*	0

\*LOD= 17 µM.

Los resultados indican que el aminoácido isoleucina (ILE) es excretado principalmente por individuos con cáncer de próstata localizado, ya que el 82% (9

casos) de los pacientes presentaron ILE en la orina, lo cual sugiere que los niveles del aminoácido incrementan considerablemente con la presencia del tumor maligno en esta glándula. En el caso de los pacientes con diagnóstico negativo para cáncer de próstata después de la biopsia, sólo se detectó en el 41% (7 casos) de los individuos, como se señala en la tabla 20. Las altas concentraciones de ILE para este grupo de pacientes, podrían atribuirse a otras patologías en la próstata diferentes al cáncer (prostatitis o hiperplasia prostática benigna). Para el grupo de pacientes sin afecciones en la próstata, no se detectó ILE en la orina. Estos resultados coinciden con los reportados por Hernández <sup>[33]</sup> y McGregor-Johnson <sup>[34]</sup>.

En la figura 26 se representan las concentraciones de ILE obtenidas en este trabajo, junto con las reportadas por Hernández <sup>[33]</sup>. Como se puede apreciar, las concentraciones de ILE son comparables a las determinadas por Hernández en su estudio <sup>[33]</sup>. Al realizar un análisis estadístico, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza en las medianas de los grupos estudiados.



**Figura 26.- Intervalos de concentración de isoleucina para los grupos de pacientes analizados con respecto a los reportados por Hernández <sup>[33]</sup>.**

En virtud de lo expuesto anteriormente, se puede decir que la determinación de la concentración de ILE en orina, podría representar a futuro un medio de diagnóstico de gran utilidad para identificar los pacientes con patologías prostáticas, para ello es necesario comprobar estos resultados preliminares con un estudio de numerosos casos que permita realizar un análisis estadístico con mayor precisión.

## CONCLUSIONES

- La determinación de isoleucina en muestras de orina por la técnica cromatografía de líquidos (HPLC) con detección UV, se obtuvo con un porcentaje de recuperación de 97%.
- El límite de detección (LOD) encontrado para la isoleucina es 17  $\mu\text{mol/L}$  y el de cuantificación (LQD) de 57  $\mu\text{mol/L}$ .
- Se encontraron valores de concentración de isoleucina por encima del LOD para el 82% de los pacientes con cáncer de próstata, en un rango de 17-1541  $\mu\text{mol/L}$ .
- Se encontraron valores de concentración de isoleucina por encima del LOD para el 41% de los pacientes con diagnóstico negativo para cáncer de próstata, en un rango de 17-1337  $\mu\text{mol/L}$ .
- Los valores de concentración de isoleucina en el grupo de sujetos sanos se encuentran por debajo del límite de detección.
- El aminoácido ILE es excretado en la orina por el 57,1 % de los pacientes sometidos a la biopsia prostática (Grupos 1 y 2).
- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de isoleucina en orina de los grupos de pacientes a los que les fue realizada la biopsia prostática (Grupos 1 y 2).
- Estos estudios preliminares para la determinación de ILE en orina, demuestran que posiblemente este ensayo tiene potencialidad como un medio de diagnóstico en pacientes con patologías prostáticas.

## RECOMENDACIONES

- Profundizar el estudio con un mayor número de pacientes, a fin de precisar el comportamiento de estos pacientes en función de la concentración de isoleucina en la orina.
  
- Comparar los niveles de isoleucina en orina con la concentración de elementos como el cadmio, del cual se sospecha incrementa el riesgo de padecer cáncer de próstata, con la finalidad de establecer si existe alguna relación con los niveles de aminoácido.
  
- Correlacionar el valor de  $PSA_{Libre}/PSA_{Total}$  con la concentración de isoleucina (ILE), con el objetivo de establecer si existe alguna relación.
  
- Optimizar un método de análisis para la determinación de isoleucina en la orina empleando la cromatografía de líquidos HPLC con detección de fluorescencia, para aumentar la sensibilidad del análisis.

## GLOSARIO

**Antígeno prostático específico** (Prostate-specific antigen, PSA, en inglés). Una sustancia producida por la próstata y que puede encontrarse en mayor cantidad en la sangre de hombres que tienen cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna o una infección o inflamación de la próstata.

**Benigno.** No canceroso. Los tumores benignos no se diseminan a otros tejidos de su alrededor o a otras partes del cuerpo.

**Biopsia.** La extracción de células o tejidos para ser examinados por un patólogo. El patólogo puede estudiar el tejido al microscopio o hacer otras pruebas en las células o tejidos. Cuando sólo se extrae una muestra de tejido, el procedimiento se llama biopsia incisional. Cuando se extirpa todo un bulto o un área sospechosa, el procedimiento se llama biopsia escisional. Cuando se toma una muestra de tejido o fluido con una aguja, el procedimiento se llama biopsia con aguja, o aspiración con aguja fina.

**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. La ecografía transrectal, (transrectal ultrasound, TRUS, en inglés) se usa generalmente para guiar la aguja. La muestra se examina al microscopio

**Cáncer.** Un término para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control. Las células cancerosas pueden invadir tejidos cercanos y diseminarse a otras partes del cuerpo por medio del torrente sanguíneo y del sistema linfático

**Carcinoma.** El cáncer que crece en cualquier tejido epitelial que cubre las superficies internas o externas del cuerpo; p. ej., cáncer de piel, pulmón, mamas, próstata y colon

**Célula.** La unidad individual de la que se componen todos los tejidos del cuerpo. Todos los seres vivos se componen de una célula o más.

**Ecografía transrectal.** Procedimiento en el cual una sonda que emite ondas sonoras de alta energía se inserta en el recto. Las ondas sonoras se hacen rebotar en los tejidos o los órganos internos y hacen eco. Los ecos forman una imagen, sonograma, del tejido corporal. Este procedimiento se usa para buscar anomalías en el recto y en las estructuras vecinas, incluyendo la próstata. También se llama ultrasonido endorrectal.

**Hiperplasia prostática benigna (HPB).** Un estado benigno (no canceroso) en el que el tejido de la próstata sobrecrece y empuja contra la uretra y la vejiga bloqueando el flujo de orina. También se llama hipertrofia prostática benigna.

**Maligno.** Los tumores malignos pueden invadir y destruir tejidos cercanos y diseminarse a otras partes del cuerpo.

**Metástasis.** La diseminación del cáncer de una parte del cuerpo a otra. El tumor que se forma de células que se han diseminado se llama "tumor metastático" o "metástasis". El tumor metastático contiene células que son como las del tumor original (primario).

**Neoplasia intraepitelial prostática.** Crecimiento no canceroso de las células que cubren las superficies internas y externas de la glándula de la próstata.

**Próstata.** Una glándula en el sistema reproductor masculino. La próstata rodea la parte de la uretra (el tubo que vacía la vejiga) exactamente debajo de la vejiga y produce un fluido que forma parte del semen

**Prostatitis.** Inflamación de la glándula prostática.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] [www.who.int/es/](http://www.who.int/es/) (Revisado, Julio 2010).
- [2] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001289.htm> (Revisado, Julio 2010)
- [3] [www.proyectosalutia.com/cancer/](http://www.proyectosalutia.com/cancer/) (Revisado, Julio 2010)
- [4] [http://www.buscandolasalud.com/contenido\\_cancer\\_1.html](http://www.buscandolasalud.com/contenido_cancer_1.html) (Revisado, Julio 2010)
- [5] <http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=0b21bdaa-d1b7-47ef-8d3c-c6c194a26fe8&chunkiid=126535> (Revisado, Julio 2010)
- [6] [www.seom.org/es/.../959-que-es-el-cancer](http://www.seom.org/es/.../959-que-es-el-cancer) (Revisado, Agosto 2010)
- [7] <http://www.tecnologiahechapalabra.com/salud/especialidades/articulo.asp> (Revisado, Agosto 2010)
- [8] <http://www.lasalud.com/pacientes/prostata.htm#1> (Revisado, Agosto 2010)
- [9] <http://www.drgdiaz.com/eco/prostata/index.shtml> (Revisado, Agosto 2010)
- [10] <http://www.geosalud.com/urologia/prostata.htm> (Revisado, Julio 2010)
- [11] <http://msd.com.ve/msdve/patients/prostata/tedisfu01.html> (Revisado, Octubre 2010)
- [12] <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2006/08/23/oncologia/1156343984.html> (Revisado, Julio 2010)
- [13] <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/prostata/Patient> (Revisado, Julio 2010)
- [14] <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Invitado/Mis%20documentos/Articulos%20PDF/Revista%20venezolana%20de%20oncolog%C3%ADa%20%28Est%29.htm> (Revisado, Agosto 2010)
- [15] Capote, L. Frecuencia del Cáncer en Venezuela. Fascículo N° 2, publicado por Banco de Drogas Antineoplásicas, 2008.
- [16] [www.atinabiotec.cl/.../Biomarcadores-una-esperanza-para-el-cancer.html](http://www.atinabiotec.cl/.../Biomarcadores-una-esperanza-para-el-cancer.html) (Revisado, Agosto 2010)
- [17] [http://www.cancer.org/docroot/ESP/content/ESP\\_2\\_1x\\_Marcadores\\_tumorales.asp](http://www.cancer.org/docroot/ESP/content/ESP_2_1x_Marcadores_tumorales.asp) (Revisado, Agosto 2010)
- [18] <http://www.eps-salud.com.ar/marcadores-biologicos.htm> (Revisado, Agosto 2010)

- [19] <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/65/1500/86/1v65n1500a13055187pdf001.pdf> (Revisado, Agosto 2010)
- [20] Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental 1996-2001, The University of Arizona [online] <http://www.atinabiotec.cl/content/view/147>. (Revisado, Agosto 2010).
- [21] Horton H., Moran L., Ochs K., Rawn D., Scrimgeour G. Bioquímica. Tercera edición. Prentice – Hall. México, 1981.
- [22] <http://www.nutricion.pro/11-08-2010/aminoacidos-2/aminoacidos-isoleucina-reguladora-del-azucar-en-sangre> (Revisado, Agosto 2010).
- [23] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003366.htm> (Revisado, Agosto).
- [24] Serkova NJ., Gamito EJ., Jones RH., O'Donnel C., Brown. JL, Green S., Sullivan H., Hedlund T., Crawford ED. 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 Charite, 68: 620-628, 2008.
- [25] Carducci C., Birarelli M., Leuzzi 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 A, 729: 173–180, 1996.
- [26] Schwarz E., Roberts W., Pasquali M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. Clinica Chimica Acta, 354: 83-90, 2005.
- [27] Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. Mc Graw Hill. España, 2001.
- [28] Snyder, L., Kirkland, J., Glajch, J. Practical HPLC Method Development, segunda edición. John Sons, 1997.
- [29] Phulwinder K. Grover and Martin I. Resnick. Analysis of Prostatic Fluid: Evidence for the Presence of a Prospective Marker for Prostatic Cancer. The Prostate 26: 1 2-18, 1995.
- [30] Gunjan Malik,<sup>1</sup> Michael D. Ward,<sup>1</sup> Saurabh K. Gupta,<sup>1</sup> Michael W. Trosset, William E. Grizzle, Bao-Ling Adam, Jose I. Diaz, and O. John Semmes. Serum Levels

of an Isoform of Apolipoprotein A-II as a Potential Marker for Prostate Cancer. *Clinical Cancer*, 11: 1073–1085,2005.

[31] Sreekumar A., Poisson L., 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., Omenn G., Ghosh D., Pennathur S., Alexander D., Berger A., Shuster J., Wei J., Varambally S., Beecher C., Chinnaiyan A. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. [Nature, 457: 910-914.](#) 2009.

[32] Nilsson, J. Descubren un nuevo método para determinar la gravedad del cáncer de próstata, 2009.

[33] Hernández, M. “Estudio de los niveles de isoleucina en orina como un biomarcador de cáncer de próstata”. Centro de Química Analítica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Venezuela, 2010.

[34] McGregor, R and Johnson, D. Urinary amino acid excretion patterns in cancer of prostate. *Urology*, 8: 127-128, 1976.

[35] Laitinen, H; Harris, W. Análisis Químico. Primera edición. Reverté.

[36] Miller, J. N. y Miller, J. C. Estadística y quimiometría para química analítica, cuarta edición. España: Prentice Hall, 2002.

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

[38] Skoog, D., West, D. Química Analítica, séptima edición. McGraw Hill, 2000.

[39] <http://www.nci.nih.gov/> (Revisado, Mayo 2011).

[40] <http://www.urologia.tv/icua/es/diseases.aspx?cod=1> (Reviasdo, Mayo 2011).

## APÉNDICE

### Anexo 1.- Consentimiento de información a los pacientes.

#### **ESTUDIO DEL NIVEL DE ISOLEUCINA EN ORINA Y SU RELACIÓN CON EL 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 2.- Resultado de biopsia con diagnóstico positivo para cáncer de próstata.

<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA FACULTAD DE MEDICINA INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO "DR. JOSÉ ANTONIO O'DALY" Centro Nacional de Referencia en Anatomía Patológica</p> <p>Muestra: B-008628-10</p> <p><b>DIAGNÓSTICO:</b></p> <p>Nº 1. PROSTATA LATERAL IZQUIERDO (PORCIÓN BASAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR. - INFILTRADO INFLAMATORIO MONONUCLEAR ESTROMAL ESCASO.</p> <p>Nº 2. PROSTATA LATERAL IZQUIERDO (PORCIÓN MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - ESTROMA FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.</p> <p>Nº 3. PROSTATA LATERAL IZQUIERDO (PORCIÓN APICAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.</p> <p>Nº 4. PROSTATA PARASAGITAL IZQUIERDO (PORCIÓN BASAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - ADENOCARCINOMA GLEASON 7 (3+4). - NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1. - PORCENTAJE GRADO 3: 80%. - PORCENTAJE GRADO 4: 20%. - TAMAÑO DEL TUMOR: 1 mm. - PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 7%. - INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA. - INFILTRACION PERINEURAL: NO OBSERVADA.</p> <p>Nº 5. PROSTATA PARASAGITAL IZQUIERDO (PORCIÓN MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.</p> <p>Nº 6. PROSTATA PARASAGITAL IZQUIERDO (PORCIÓN APICAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRADO (PIN 2).</p> <p>Nº 7. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCIÓN BASAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - ADENOCARCINOMA GLEASON 7 (3+4). - NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1. - PORCENTAJE GRADO 3: 60%. - PORCENTAJE GRADO 4: 40%. - TAMAÑO DEL TUMOR: 5 mm. - PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 30%. - INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA. - INFILTRACION PERINEURAL: NO OBSERVADA.</p>	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA FACULTAD DE MEDICINA INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO "DR. JOSÉ ANTONIO O'DALY" Centro Nacional de Referencia en Anatomía Patológica</p> <p>Muestra: B-008628-10</p> <p>Nº 8. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCIÓN MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - ADENOCARCINOMA GLEASON 7 (3+4). - NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1. - PORCENTAJE GRADO 3: 90%. - PORCENTAJE GRADO 4: 10%. - TAMAÑO DEL TUMOR: 4 mm. - PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 25%. - INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA. - INFILTRACION PERINEURAL: NO OBSERVADA.</p> <p>Nº 9. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCIÓN APICAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - ADENOCARCINOMA GLEASON 7 (3+4). - NUMERO DE FRAGMENTOS COMPROMETIDOS: 1/1. - PORCENTAJE GRADO 3: 90%. - PORCENTAJE GRADO 4: 10%. - TAMAÑO DEL TUMOR: 2 mm. - PORCENTAJE TOTAL DE TUMOR EN LA MUESTRA: 12%. - INVASION VASCULO-LINFATICA: NO OBSERVADA. - INFILTRACION PERINEURAL: NO OBSERVADA.</p> <p>Nº 10. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCIÓN BASAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR. - GLANDULAS HIPERPLASICAS.</p> <p>Nº 11. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCIÓN MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR. - GLANDULAS HIPERPLASICAS.</p> <p>Nº 12. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCIÓN APICAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.</p> <p>DRA. JENNY GARCÍA DR. JOSE DAVID MOTA</p> <p>SCH-O 06/10/2010 PES</p>
---	---

### Anexo 3.- Resultado de biopsia con diagnóstico negativo para cáncer de próstata.

<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA FACULTAD DE MEDICINA INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO "DR. JOSÉ ANTONIO O'DALY" Centro Nacional de Referencia en Anatomía Patológica</p> <p>Muestra: B-008208-10</p> <p><b>DIAGNÓSTICO:</b></p> <p>Nº 1. PROSTATA LATERAL IZQUIERDO (PORCION BASAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR. - INFILTRADO INFLAMATORIO MONONUCLEAR ESTROMAL ESCASO.</p> <p>Nº 2. PROSTATA LATERAL IZQUIERDO (PORCION MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - GLANDULAS HIPERPLASICAS.</p> <p>Nº3. PROSTATA LATERAL IZQUIERDO (PORCION APICAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - GLANDULAS ATROFICAS. - GLANDULAS HIPERPLASICAS.</p> <p>Nº4. PROSTATA PARASAGITAL IZQUIERDO (PORCION BASAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.</p> <p>Nº5. PROSTATA PARASAGITAL IZQUIERDO (PORCION MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - HIPERPLASIA POST-ATROFICA. - INFILTRADO INFLAMATORIO MONONUCLEAR ESTROMAL ESCASO.</p> <p>Nº6. PROSTATA PARASAGITAL IZQUIERDO (PORCION APICAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.</p> <p>Nº7. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCION BASAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.</p> <p>Nº8. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCION MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - ESTROMA FIBROMUSCULAR LIBRE DE TUMOR. - INFILTRADO INFLAMATORIO MONONUCLEAR ESTROMAL ESCASO. - Nº9. PROSTATA LATERAL DERECHO (PORCION APICAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR LIBRE DE TUMOR. - GLANDULAS ATROFICAS. - INFILTRADO INFLAMATORIO MONONUCLEAR ESTROMAL ESCASO.</p> <p>Nº10. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCION BASAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR.</p>	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA FACULTAD DE MEDICINA INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO "DR. JOSÉ ANTONIO O'DALY" Centro Nacional de Referencia en Anatomía Patológica</p> <p>Muestra: B-008208-10</p> <p>Nº11. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCION MEDIAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR. - INFILTRADO INFLAMATORIO MONONUCLEAR ESTROMAL ESCASO.</p> <p>Nº12. PROSTATA PARASAGITAL DERECHO (PORCION APICAL); BIOPSIA POR PUNCIÓN: - TEJIDO FIBROMUSCULAR Y GLANDULAR PROSTATICO LIBRE DE TUMOR. - GLANDULAS ATROFICAS.</p> <p>DR. JOSE DAVID MOTA dr15/09/10</p>
--	---

#### **Anexo 4.- Modelos de cálculos.**

##### **Concentración de la solución madre de isoleucina (ILE).**

$$[ILE] = (0,0267 \text{ g} * (1 \text{ mol} / 131,174 \text{ g}) * (1 * 10^6 \text{ } \mu\text{mol} / 1 \text{ mol})) / 0,1 \text{ L} = 2035,464345 \text{ } \mu\text{mol} / \text{L}$$

$$S_{[ILE]} = 2035,464345 \text{ } \mu\text{mol} / \text{L} * ((0,0001 / 0,0267)^2 + (0,08 / 100)^2)^{1/2}$$

$$S_{[ILE]} = 8$$

$$[ILE] = (2036 \pm 8) \mu\text{M}$$

##### **Concentración de los patrones de isoleucina (ILE).**

La concentración de las soluciones patrón de ILE se determinó a partir de la ecuación 1, como se muestra a continuación.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \text{ (ec.1)}$$

$$C_1 = 2036 \text{ } \mu\text{M}, V_1 = V_{\text{Alícuota}}, C_2 = C_{\text{Patrón}}, V_2 = V_{\text{Total}} = 200 \text{ } \mu\text{L}$$

$$C_2 = C_1 * V_1 / V_2$$

##### **Concentración de la solución de o-ftaldialdehído (OPA).**

$$[OPA] = 201,6 \text{ mg} / 10 \text{ mL} = 20,16 \text{ mg} / \text{mL}$$

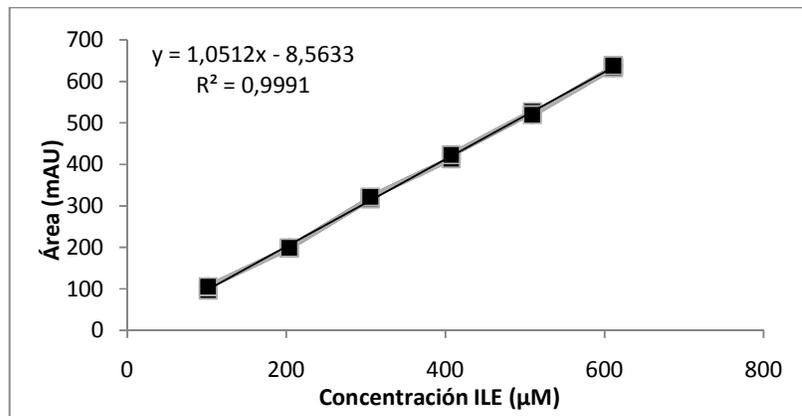
$$S_{[OPA]} = 20,16 \text{ mg} / \text{mL} * ((0,0001 / 0,2016)^2 + (0,02 / 10)^2)^{1/2}$$

$$S_{[OPA]} = 0,04$$

$$[OPA] = (20,16 \pm 0,04) \text{ mg} / \text{mL}$$

##### **Concentración de isoleucina en las muestras de orina.**

Para la determinación de la concentración de isoleucina en las muestras de orina se utilizó la curva de calibración que se muestra a continuación, y antes señalada en el capítulo IV.



Curva de calibración.

Las señales de área obtenidas para las réplicas de la muestra 31 fueron:

$$A_1 = 412,1 \text{ mAU}, A_2 = 407,1 \text{ mAU}$$

Sabiendo que la ecuación para la recta es:

$$y = ax + b \text{ (ec.2); } a = 1,0512, b = - 8,5633, x = [\text{ILE}]_{\text{Diluida}}$$

Entonces:

$$[\text{ILE}]_{\text{Diluida}} = ((A + 8,5633) / 1,0512)$$

$$[\text{ILE}]_{\text{Diluida1}} = 400,1744 \text{ } \mu\text{M}, [\text{ILE}]_{\text{Diluida2}} = 395,4179 \text{ } \mu\text{M}$$

$$[\text{ILE}]_{\text{Real}} = [\text{ILE}]_{\text{Diluida}} * (V_{\text{Total}} / V_{\text{Orina}})$$

Donde:

$$V_{\text{Total}} = 200 \text{ } \mu\text{L}, V_{\text{Orina}} = 75 \text{ } \mu\text{L}$$

$$[\text{ILE}]_{\text{Real1}} = 1067,1317 \text{ } \mu\text{M}, [\text{ILE}]_{\text{Real2}} = 1054,4477 \text{ } \mu\text{M}$$

$$[\text{ILE}]_{\text{Promedio}} = 1061 \text{ } \mu\text{M}$$

$$[\text{ILE}] = (1061 \pm 6) \text{ } \mu\text{M}$$

### Resolucion del pico de isoleucina.

A: Analito más retenido.

B: Analito menos retenido.

$$R_S = \frac{t_{RA} - t_{RB}}{0,5 * (W_A + W_B)} \quad (\text{ec.3})$$

$$R_S = \frac{12,213 - 10,435}{0,5 * (1,1 - 0,5)} = 5,93$$

### Anexo 5.- Cromatogramas de los patrones de isoleucina.

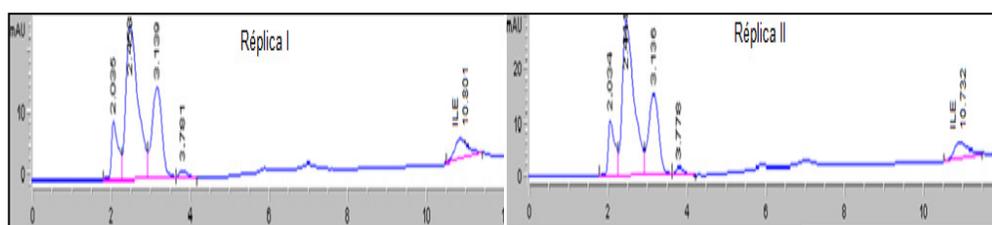


Figura 27.- Patrón de 100 µM.

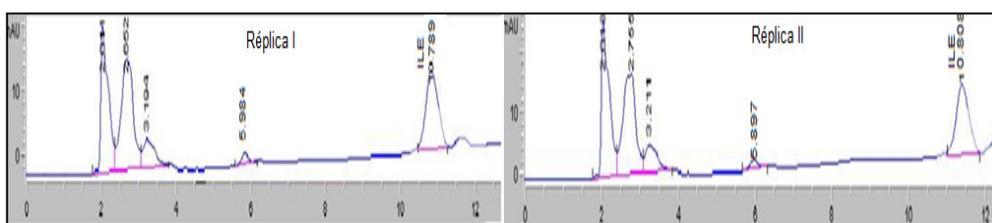


Figura 28.- Patrón de 200 µM.

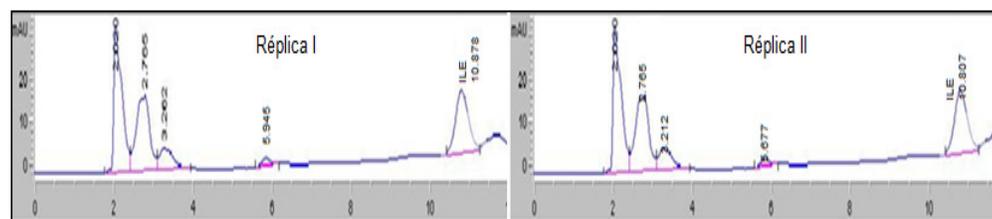


Figura 29.- Patrón de 300 µM.

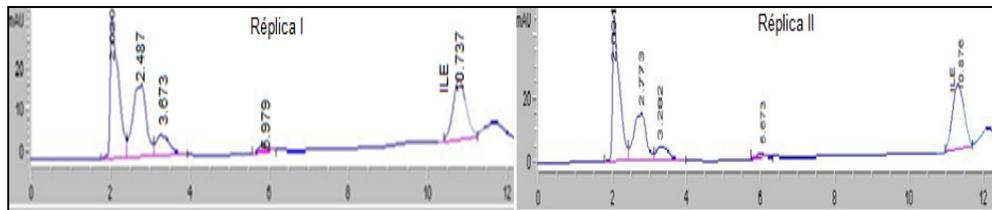


Figura 30.- Patrón de 400 µM.

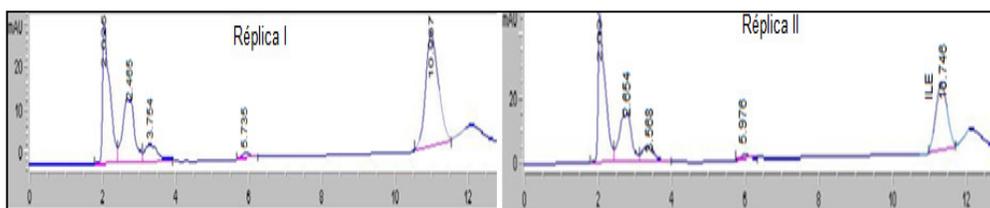


Figura 31.- Patrón de 500 µM.

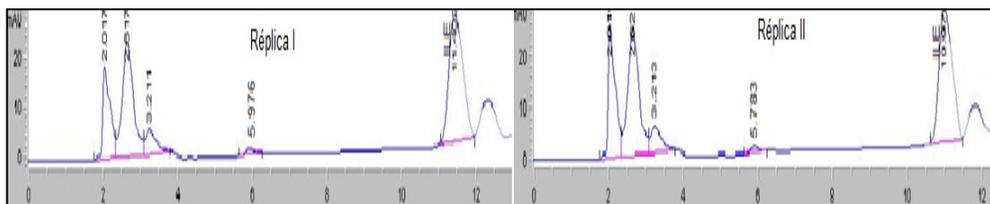


Figura 32.- Patrón de 600 µM.

Anexo 6.- Cromatograma de las muestras de orina del grupo 1.

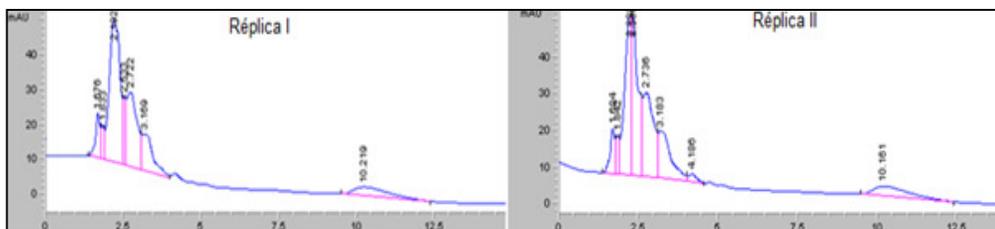


Figura 33.- Réplicas de la muestra 13.

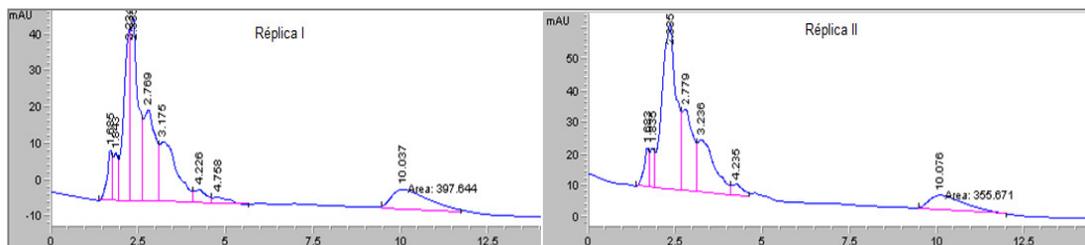


Figura 34.- Réplicas de la muestra 39.

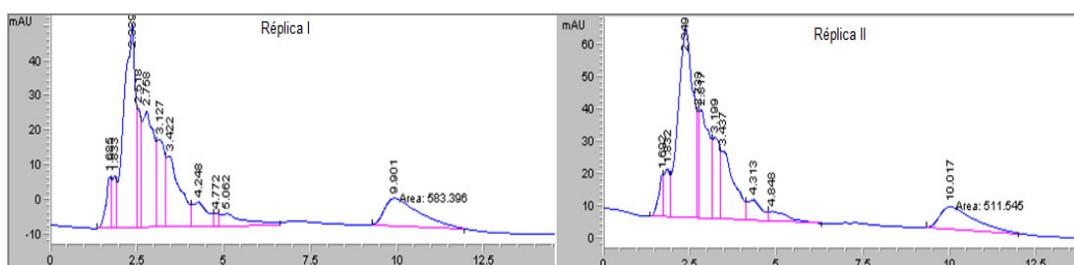


Figura 35.- Réplicas de la muestra 50.

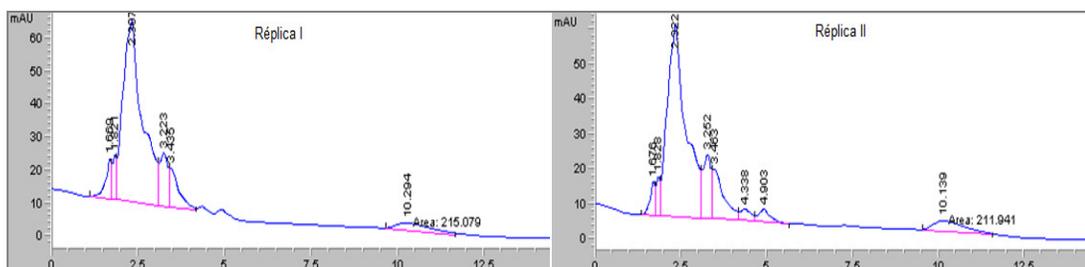


Figura 36.- Réplicas de la muestra 59.

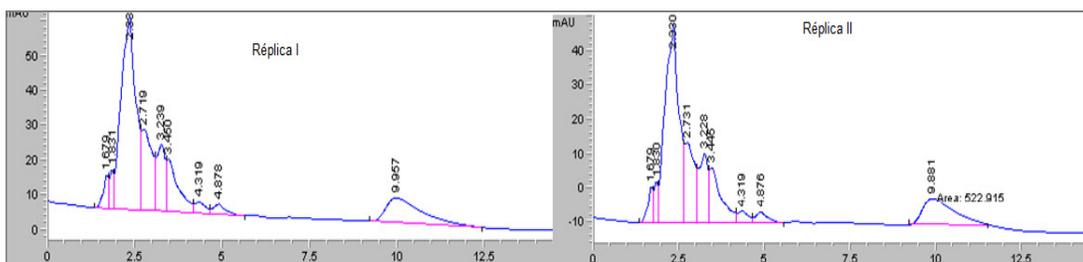


Figura 37.- Réplicas de la muestra 45.

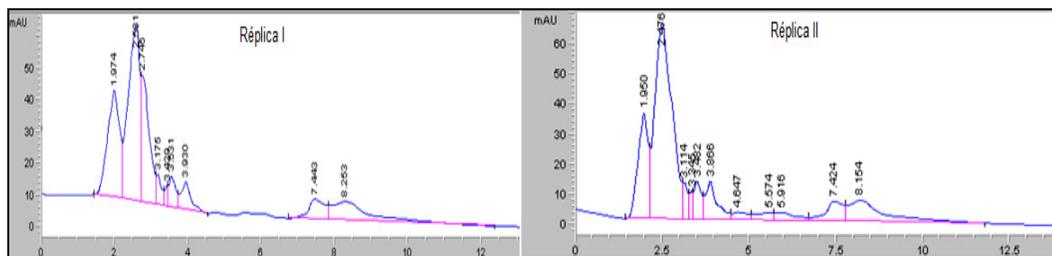


Figura 38.- Réplicas de la muestra 21.

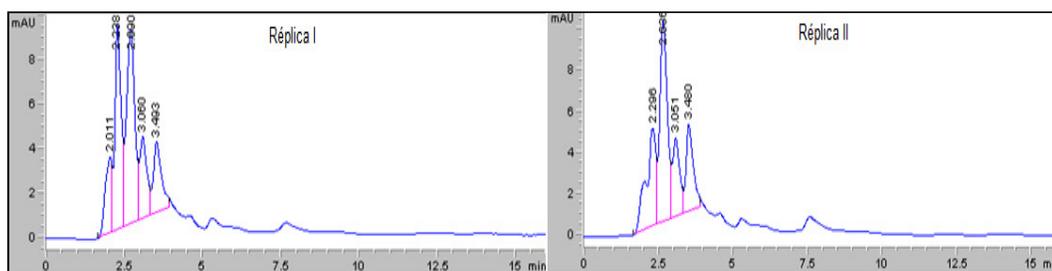


Figura 39.- Réplicas de la muestra 32.

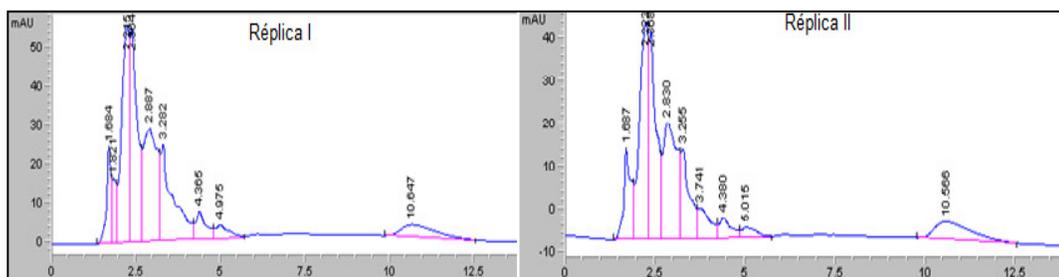


Figura 40.- Réplicas de la muestra 22.

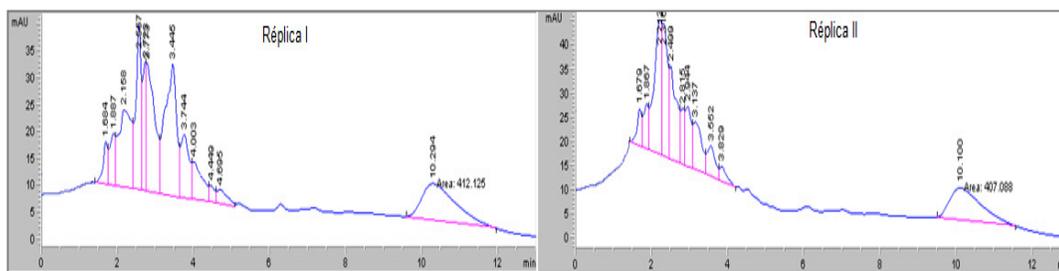


Figura 41.- Réplicas de la muestra 31.

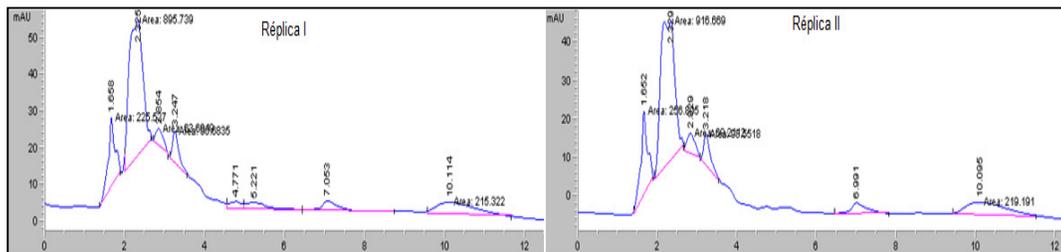


Figura 42.- Réplicas de la muestra 33.

Anexo 7.- Cromatogramas de las muestras de orina del grupo 2.

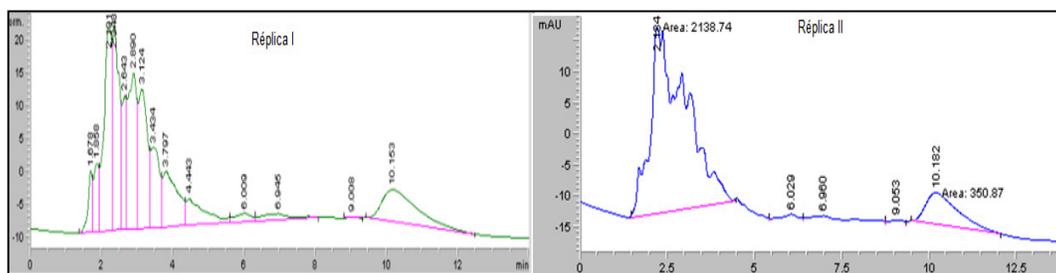
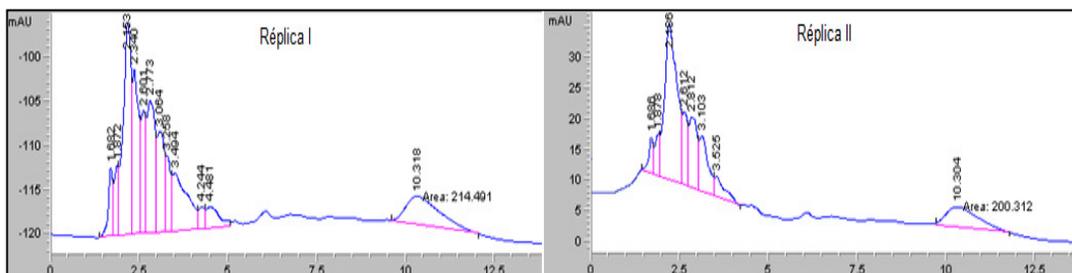


Figura 43.- Réplicas de la muestra 36.



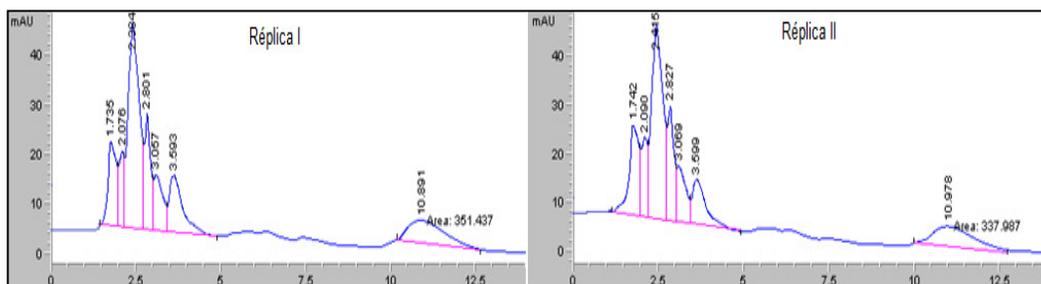


Figura 46.- Réplicas de la muestra 44.

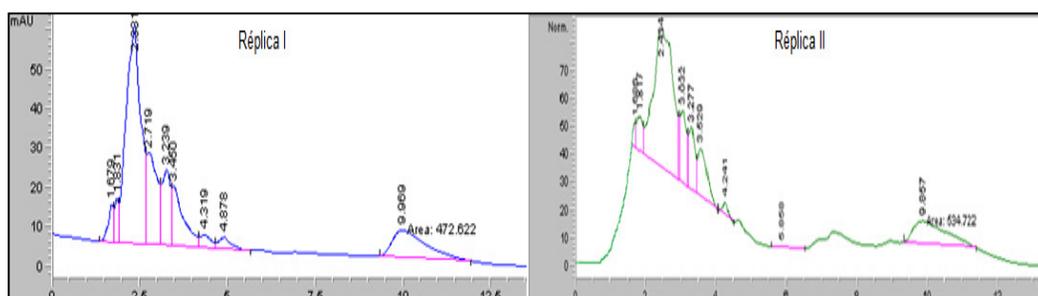


Figura 47.- Réplicas de la muestra 61.

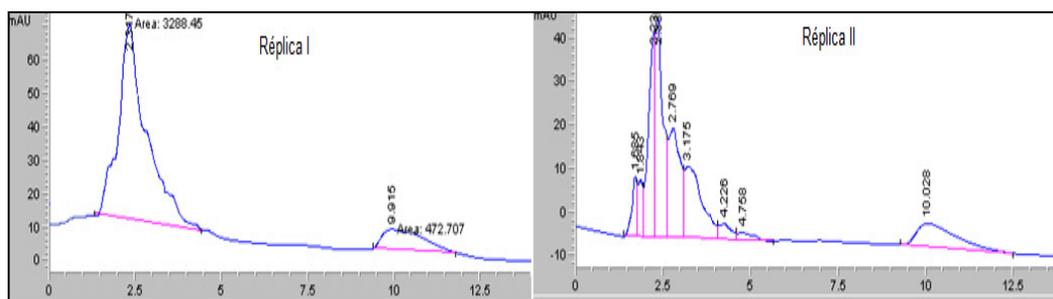


Figura 48.- Réplicas de la muestra 10.

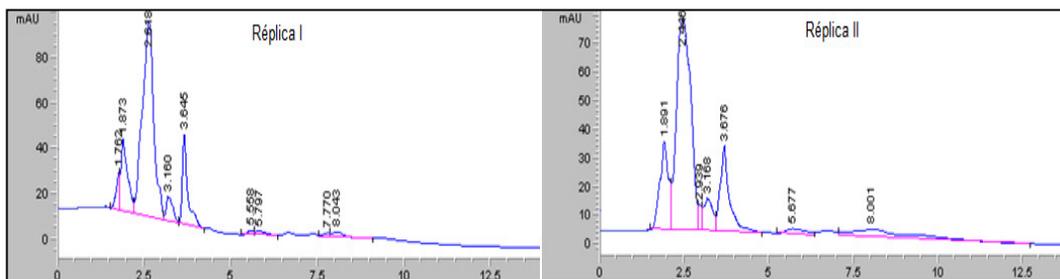


Figura 49.- Réplicas de la muestra 1.

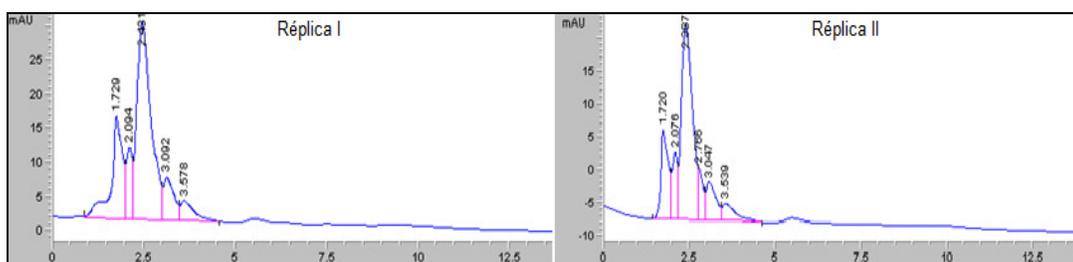


Figura 50.- Réplicas de la muestra 9.

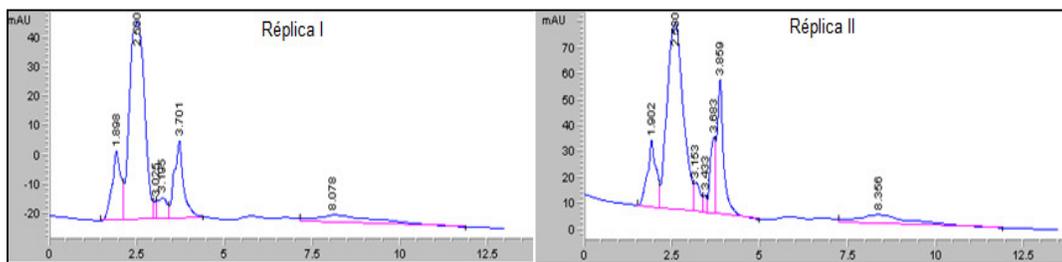


Figura 51.- Réplicas de la muestra 16.

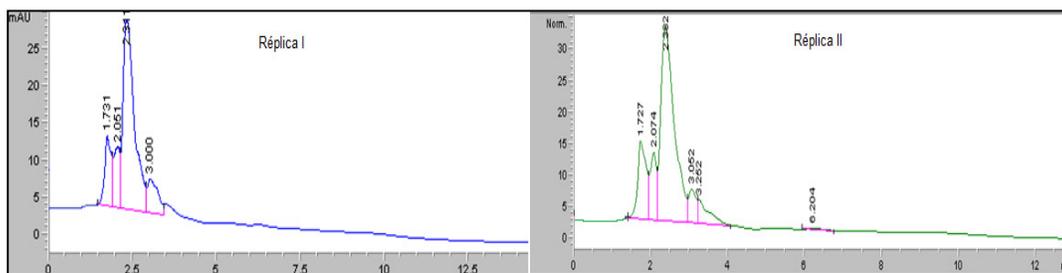


Figura 52. Réplicas de la muestra 28.

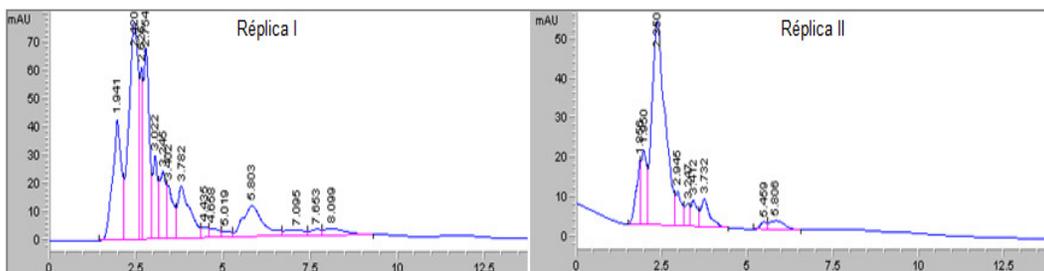


Figura 53.- Réplicas de la muestra 43.

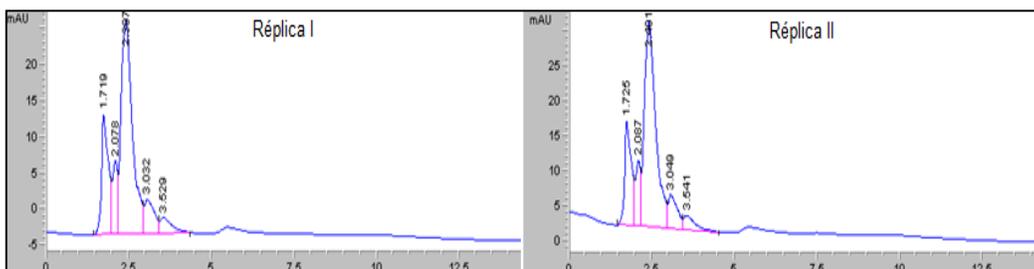


Figura 54.- Réplicas de la muestra 47.

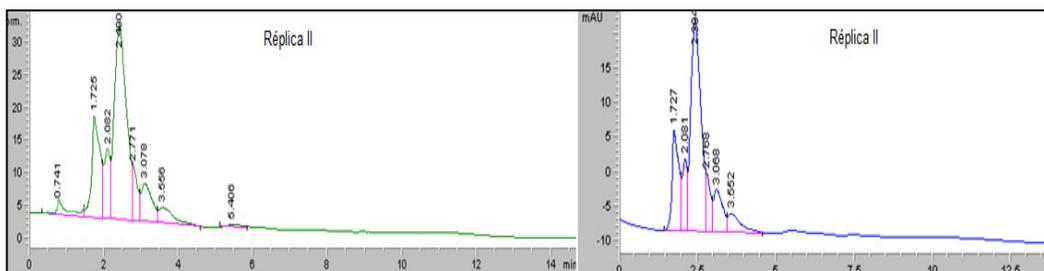


Figura 55.- Réplicas de la muestra 49.

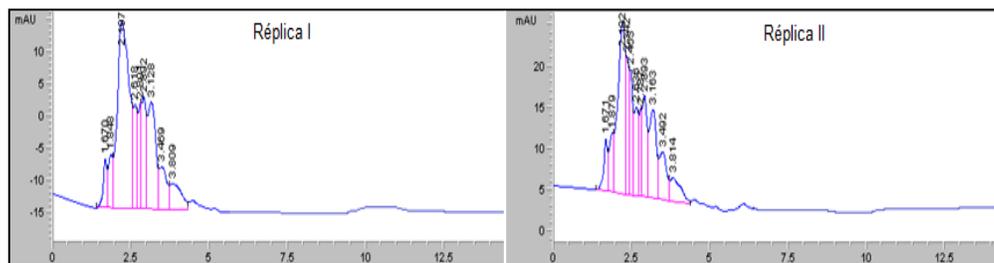
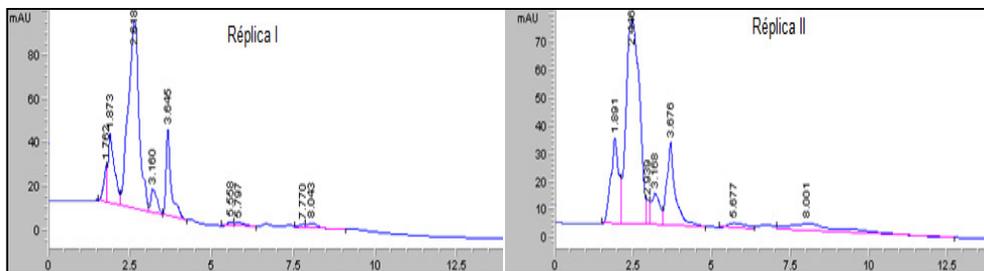
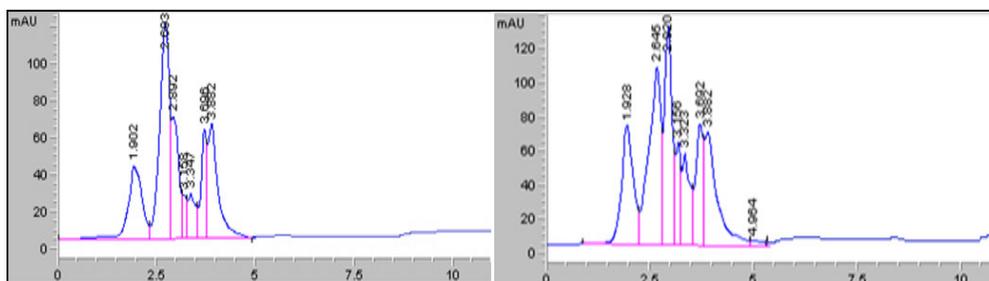


Figura 56.- Réplicas de la muestra 66.

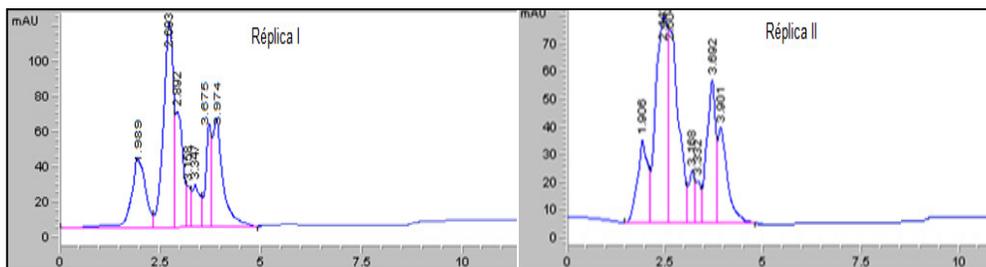
**Anexo 8.- Cromatogramas de las muestras de orina de individuos sanos.**



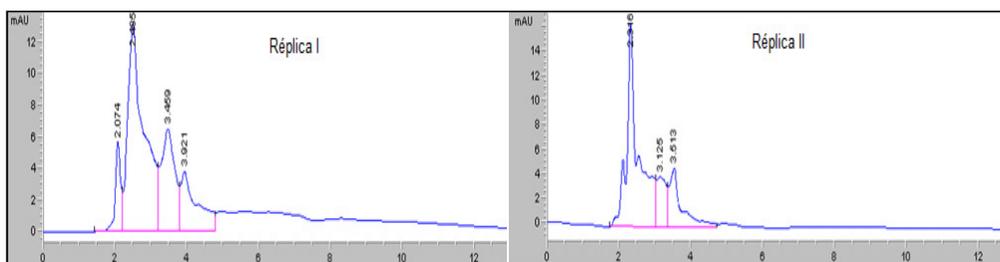
**Figura 57.- Réplicas de la muestra 9.**



**Figura 58.- Réplicas de la muestra 4.**



**Figura 59.- Réplicas de la muestra 5.**



**Figura 60.- Réplicas de la muestra 10.**

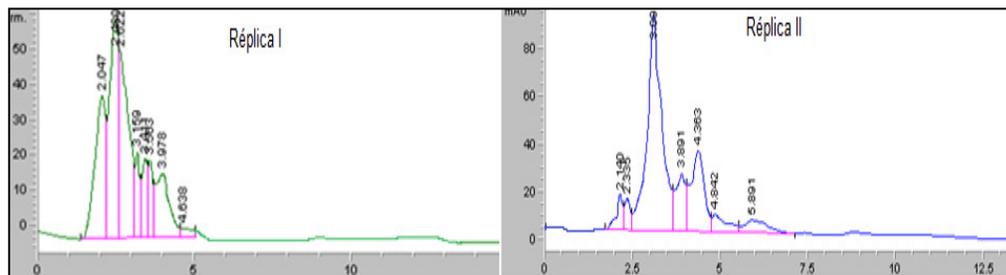


Figura 61.- Réplicas de la muestra 7.

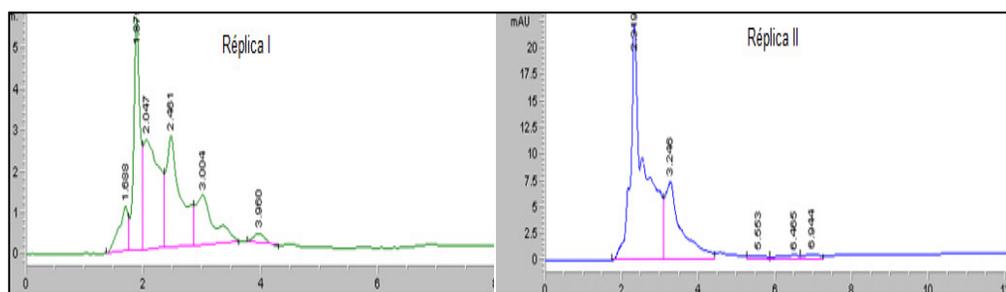


Figura 62.- Réplicas de la muestra 12.

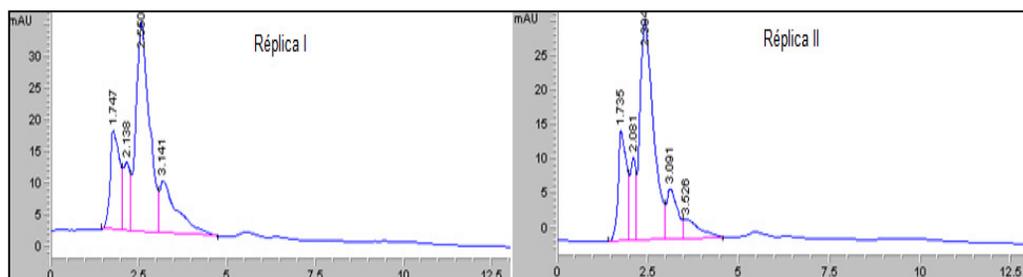


Figura 63.- Réplicas de la muestra 8.