

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

1

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA UNAM

**DETERMINACION DE OXIDO NITRICO POR
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION
(HPLC), EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A ;
RAQUEL / BECERRIL BECERRIL

DIRECTOR DE TESIS: Dr. en C. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

MEXICO, D.F.

2000

279697



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE	Paginas
RESUMEN	3
I. - OBJETIVOS.	4
II. - INTRODUCCION:	5
1. - El NO en los Fenómenos Biológicos.	5
2. - Características generales del NO.	7
3. - Biosíntesis del NO.	8
4. - Inhibición de la biosíntesis del NO.	10
5. - Funciones del óxido nítrico (NO):	11
5.a. - En Macrófagos.	11
5.b. - En el Cerebro.	13
5.c. - Como Vasodilatador.	14
III.- IMPORTANCIA DE LA MEDICION DEL NO.	17
IV.- METODOS UTILIZADOS PREVIAMENTE PARA LA MEDICION DEL NO.	19
1. - Métodos de medición directa.	20
1.a. -Ensayo de Quimioluminiscencia.	20
2. - Métodos de medición indirecta.	20
2.a. - Ensayo de Diazotización.	20
2.b. - Ensayo de Espectrofotómetro con meta hemoglobina.	22
2.c. - Ensayo con Micro electrodo.	23
2.d. - Método de Stainton.	23
2.e. - Espectrofotometría de Masas.	24
3. -Fundamento de la Cromatografía Líquido de Alta Resolución (HPLC).	25
3.a. -Fundamento del nuevo método.	27
V.- MATERIAL Y EQUIPO.	28
1. - Equipo de Medición.	
2. - Equipo para Purificación de la muestra.	
3. - Reactivos.	

VI.- METODO.	29
1. - Estandarización del Método.	29
1.a. - Determinación de longitud de onda adecuada para NO ₂ /NO ₃ .	29
1.b. - Identificación de interferencia de contaminantes.	29
1.c. - Confiabilidad del agua HPLC utilizada en el proceso.	30
1.d. - Curva tipo.	30
2.- Preparación de las muestras biológicas para su inyección en el HPLC.	31
2.a. - Precipitación de proteínas por medio de ácidos.	31
2.b. - Proceso de purificación de NO ₂ /NO ₃ , de muestras biológicas por tamices moleculares (Uf), por fase reversa (Sep-pak).	31
2.c. -Determinación de proteínas en el proceso de purificación por filtración.	33
2.d. - Interferencia del ion cloruro (Cl ⁻) con NO ₂ /NO ₃ .	33
3. - Extracción de NO ₂ /NO ₃ en experimentos biológicos.	34
3.a. - Experimento que se utiliza la mezcla (NO ₂ /NO ₃ /Br), con medio de cultivo sin rojo de fenol.	34
3.b. - Experimento con glomé enulos medio de cultivo.	34
3.d. - Determinación de NO ₂ /NO ₃ , en orina de voluntarios sanos.	37
VII.-RESULTADOS.	38
VIII.- DISCUSIÓN.	63
IX CONCLUSION.	64
X.-REFERENCIAS.	65

RESUMEN

El NO es un gas inestable que reacciona fácilmente con el oxígeno produciendo nitrito, que a su vez se convierte a nitrato. El NO se produce de manera natural en varias células, entre las que destacan; macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, cerebrales y mesangiales de los glomérulos renales. Entre algunas funciones importantes del NO, se menciona su acción como vasodilatador en las células musculares vasculares.

Los métodos de detección empleados son muy variados, tales como: el ensayo de quimioluminiscencia, diazotización, espectrofotometría con meta hemoglobina, espectrofotometría de masas. La mayoría de ellos requieren de la acidificación de las muestras para precipitar las proteínas y para reducir el NO a nitrato y posteriormente a nitritos por ser éste último el que se detecta. Sin embargo la acidificación puede variar los valores de los resultados.

La importancia de medir nitratos y nitritos, es tener una relación indirecta de las concentraciones de NO. Este trabajo describe un método sensible, directo y específico en la detección simultánea de nitritos y nitratos (NO_2/NO_3), así como su aplicación en la determinación del óxido nítrico (NO) en fluidos biológicos, el cual puede medir de forma indirecta a los metabolitos del NO.

Se analizaron muestras de orina de sujetos sanos y sobrenadantes de medios de cultivo con glomérulos. A cada muestra problema y controles preparados, se adicionó como estándar interno NaBr y poder tener un control en la cantidad que se pretende identificar. Las muestras fueron desproteinizadas por centrifugación a 6000 xg sobre membrana de polisulfona y se eliminaron los péptidos por adsorción en silanos C-18.

Inicialmente encontramos una metodología que nos permite medir (NO_2/NO_3) en líquidos, por el análisis de (HPLC); La cromatografía que se realizó es, una columna de intercambio iónico IC-Pak-HR Waters de 7.5 cm de longitud y 0.46cm de D: I: Se utilizó un sistema isocrático, a una presión de 1000 psi, y una velocidad de flujo de 0.9 ml/min. La fase móvil que se utilizó, es de LiOH a una concentración de 1.8 mM. El detector que se utilizó es UV/Vis, a una longitud de onda a 214 nm.

Se decidió estandarizar las condiciones de análisis, considerando las longitudes de onda en las cuales se detectan los NO_2/NO_3 (214 nm.). Luego analizamos las características del agua HPLC, de tal forma que el agua no llevara estos analitos como contaminantes y que afectaran nuestro proceso, así como las interferencias que pudieran presentarse de otros analitos que también afecten nuestra lectura de los medios de los cuales analizamos las muestras.

También se tomó en cuenta la calidad de los filtros, tamices y Sep-pak utilizados en el proceso de desproteinización, si hubiera la posibilidad de hacer interferencia o simplemente contaminar la muestra problema con la presencia de algún metabolito que interviene en el mismo proceso. Se compararon con nuestra agua HPLC y el proceso de desproteinización paso por paso para identificar algún contaminante posible.

Una vez estandarizado el sistema con todas las condiciones debidas; se procede a realizar una serie de experimentos, manipulando el sobrenadante del medio de cultivo de glomérulos, los cuales se cultivaron en diferentes sustancias, de tal manera que se pueda observar los cambios en la producción de los metabolitos dependiendo de la actividad de las moléculas sobre los glomérulos y finalmente, se hace la comparación en la producción de los mismos metabolitos obtenidos en orina de voluntarios sanos, los cuales se les infundió una cierta cantidad de proteínas dando un tiempo determinado (15 min.) para la toma de muestra. Se decidió tomar la lectura a los tiempos tercero y octavo de éstas muestras.

I.-OBJETIVO GENERAL.

Establecer un método para medir indirectamente NO en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sin necesidad de acidificar la muestra biológica para desproteínizarla.

OBJETIVOS:

- 1.- Estandarizar un método para la determinación del óxido nítrico (NO) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por la medición simultánea de metabolitos secundarios de nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3).
- 2.-Determinar el NO por HPLC en fluidos biológicos desproteínizados (orina, medio de cultivo de glomérulos).
3. - Evaluar la actividad celular en medios de cultivo mediante la producción de NO.

II.- INTRODUCCION

II.1.-El óxido nítrico (NO) en los fenómenos biológicos.

El NO es un compuesto que juega un papel importante en el metabolismo celular y en la fisiología debido a la regulación de la presión sanguínea, el cual, modifica el tono vascular en arterias, venas y vasos capilares; aparte de ésta actividad fisiológica molecular, tiene otras actividades, tales como, la defensa de agentes extraños en el sistema inmune y en el sistema nervioso como neurotransmisor. (Patrick Vallance, et al. 1992).

El NO es responsable de la relajación del músculo liso vascular, considerándose con actividades similares a las del factor relajante derivado del endotelio (EDRF), por lo que se ha considerado que el NO es el EDRF, producido en arterias y venas, siendo una sustancia humoral inestable, que tiene una actividad vasodilatadora dependiente del endotelio. Esto quiere decir que, la vaso dilatación obedece a la señal que proviene del endotelio, el cual libera el factor relajante, que este puede ser el NO, activado por la acetil-colina.

Evidencias químicas muestran que el EDRF que se relaciona con arterias y venas, puede ser el NO. Varios estudios, indican que las propiedades farmacológicas de EDRF y el NO en arterias y venas son idénticas, ambas son sustancias biológicamente lábiles, y su activación es acelerada por el anión superóxido y retrasada por superóxido dismutasa. Ambos EDRF y NO estimulan la producción de GMPc en arterias y venas, en una manera que correlaciona bien con su respuesta relajante. (Luis J. Ignarro. Et al. 1987).

En algunas preparaciones vasculares (venas, arterias y vasos capilares), se demostró que responden para la producción de NO a una variedad de sustancias tales como: Acetilcolina, nucleótidos de adenina, trombina, ionóforo de calcio A23187, y bradicinina. Algunos agentes, tales como nitrovasodilatadores, factor atrial natriurético, factor inhibitorio del pene bovino, agonistas a beta-adrenérgicos y postaciclina, induce relajación vascular por mecanismo del endotelio-independiente. La naturaleza humoral del EDRF se demostró, usando una variedad de preparaciones farmacológicas que por su actividad biológica transfiere un donador a un receptor. (S. Moncada, et al. 1991).

Comparando con individuos sanos, se encontró en orina de pacientes hipertensos, con problemas crónico renal, una alta concentración de dimetil arginina -asimétrica- (ADMA), y esto da lugar a una disminución en la producción de NO. Se puede explicar que la presencia de ADMA en altas concentraciones inhibe la síntesis de NO. En la enfermedad renal crónica al inhibirse la actividad del óxido nítrico sintasa (NOS) disminuye su actividad en macrófagos, también causa la contracción vascular, y por lo que, aumenta la presión sanguínea. Esta es ocasionada por la inhibición de la síntesis de NO, que es resultado de la acumulación de ADMA en el plasma, por causa del deterioro crónico renal, que no permite la excreción de

ADMA, siendo un inhibidor endógeno de NOS. Por lo tanto, la enfermedad crónica renal lleva a la hipertensión y también a una deficiencia inmunitaria. (Patrick Vallance, et al. 1992).

Por lo tanto, en esto, es necesario mencionar el requerimiento de la L-arginina, que se utiliza en la síntesis del NO, y por consiguiente se debe mencionar, como se puede inhibir dicha producción. Existen compuestos sintéticos inhibidores de la NOS que son derivados de la arginina metilada como L-N-monometil arginina (L-NMMA) y dimetil arginina. Se ha medido la concentración circulante de dimetil arginina, y se ha encontrado que la dimetil-arginina es inhibidor endógeno de la NOS evitando la producción de NO por medio de la L-arginina.

Algunas células endoteliales producen sustancias vaso activas, que inducen la elevación del NO, el cual, interviene en la función simpática y parasimpático, en la activación de células inmunes y en la regulación de la presión sanguínea en las células vasculares.

Uno de los mecanismos simples y fundamentales en el sistema cardiovascular, es la actividad vasodilatadora dependiente del NO en el endotelio, el cual se regula localmente. (Moncada, et al. 1991).

Además de los descubrimientos para precisar, existen tres razones para medir el NO:

-La existencia de múltiples vasodilatadores derivados de endotelio.

Los cuales alteran el tono vascular tales como las prostaglandinas, prostaciclina, EDRF y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) en el sistema nervioso; a todas estas evidencias, la acetil colina por ejemplo, altera el tono vascular a través de su capacidad de estimular la síntesis, ya sea de prostaglandinas, EDRF o EDHF.

-La variabilidad en el mecanismo de la vasodilatación endotelio dependiente entre especie / sitio vascular.

Se puede medir NO por la vasodilatación del endotelio, se ha observado que la acetilcolina y bradicinina pueden variar en la respuesta hemodinámica y que el mecanismo de acción es diferente en la vasculatura, por ejemplo, bradicinina produce vasodilatación pulmonar por la producción de NO pero altera el tono vascular cerebral, produciendo radicales de oxígeno.

-La no especificidad de la inhibición sobre la síntesis de EDRF.

Se ha observado la inhibición del NO como fenómeno por la administración de inhibidores del EDRF, por ejemplo, la vasoconstricción y la pérdida de la respuesta vasodilatadora después de la administración del azul de metileno debido a la inhibición de la guanilato ciclasa soluble o la administración de análogos de arginina como inhibidores de la NOS.

Desafortunadamente, muchos inhibidores de la acción de EDRF, tales como azul de metileno que son disparadores de electrones, o también agentes redox que tienen una diversidad de efectos en el bloqueo de la síntesis del EDRF. La inhibición de la síntesis de

EDRF con NG-monometil L-arginina es a veces más específica y primariamente interfiere con la conversión de la L-arginina a NO por la NOS. Sin embargo no todos los efectos hemodinámicos de éstos agentes resultan de la capacidad para inhibir la síntesis de NO. Por lo tanto a esto se debe la medición de NO. (Stephen Archer, et al. 1993).

Para el estudio del metabolismo del NOS en el hombre y en ratas, se requiere de un sistema analítico para determinar los productos de degradación que son, nitratos y nitritos en los medios biológicos, para esto se necesita de un sistema en el que se utilice poco tiempo y tenga una alta selectividad, es importante eliminar la posibilidad de obtener resultados falsos, en los que interfieren otras sustancias y no da veracidad a los datos proporcionados en la determinación. (Laura C. Green, et al. 1982).

II.2.-Características generales del óxido nítrico (NO).

El NO como tal es un gas tóxico, que se considera un radical, por que tiene dos electrones libres; es inestable. No reacciona consigo mismo, al reaccionar con el oxígeno y el agua, produce nitrito y luego nitrato. Es poco soluble en agua. 3 mM. solución saturada. Es muy corta su vida, de 6 a 10 segundos,

Su peso molecular es de 30.006, la densidad absoluta es de 101.325 pKa a 25 °C. Se reduce a óxido nitroso NO-N₂O, y se oxida de nitrato a NO N₂O-NO. Se considera como primer mensajero biológico que entra a la célula y se une con metales como; Fe, Cu, Co, Mn. Estos metales son parte funcional de los citocromos.

Tiene alta afinidad para interaccionar con la hemoglobina.

Grandes variaciones en la vida-media de EDRF (de 3 a 50 s), puede probablemente ser explicada en términos de la relativa contribución de O₂ y O₂⁻ para la iniciación de NO dentro de diferentes condiciones. Se sabe que el oxígeno reacciona rápidamente con el NO para formar NO₃ y NO₂, ambas de las cuales son activas en los vasos y en plaquetas. El NO solo demuestra la reacción con O₂⁻ para formar NO₂⁻

Desde hace muchos años se han usado diferentes medicamentos como antianginales y agentes antihipertensivos. (Stephen Archer, et al. 1993). Los nitrovasodilatadores, se han usado aproximadamente desde hace 100 años, se usa en diversos sitios en condiciones tales como en angina de pecho, insuficiencia cardíaca, emergencias de hipertensión, hipertensión pulmonar, fibrinólisis, angioplastia coronaria percutanea y complicaciones cardiacas después de la cateterización. (S. Moncada 1991)

II.3.-Biosíntesis de óxido nítrico (NO).

Algunos vasodilatadores incrementan el NO espontáneamente, tales como nitrato orgánico que requiere la previa interacción con un tiól que puede ser cisteína y algunos otros como 3 morfolino-sidnonimina, elevando NO subsecuentemente hacia la base catalizada de hidrólisis. Se sugiere que el NO es el efector final común molecular de todos los nitrovasodilatadores que activan al guanilato ciclasa soluble. (S. Moncada, et al. 1991).

El Oxido Nítrico es sintetizado a partir del nitrógeno guanidino, de la molécula L-arginina y en presencia de oxígeno molecular, con la ayuda enzimática de una dioxigenasa o NO-sintasa.

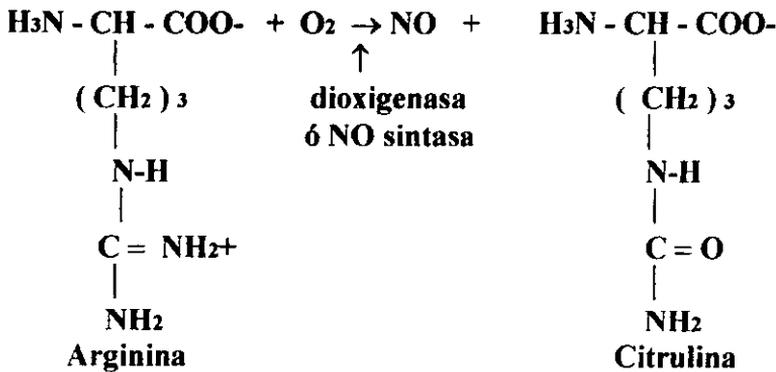


Figura 1.-Síntesis de NO por medio de L-arginina en presencia de oxígeno molecular.

La síntesis de NO requiere la presencia de ion calcio, que actúa uniéndose a un cofactor llamado calmodulina, necesario para la activación de la enzima; esta activación puede estar dada de dos formas:

- 1) La forma constitutiva, citosólica, Ca^{+2} /Calmodulina dependiente; se libera al NO por un período corto, en respuesta del receptor o una estimulación física, es decir, para estimular la sintetasa de óxido nítrico (NOS) se requiere de un ion de calcio citosólico que estimule el acercamiento y asociación de la calmodulina y NOS produciendo con esta unión las moléculas de NO y Citulina, llamando a esta forma, calcio dependiente. Esta forma se lleva a cabo en el endotelio. La liberación de NO por ésta enzima, actúa como un mecanismo de transducción subyacente a varias respuestas fisiológicas.

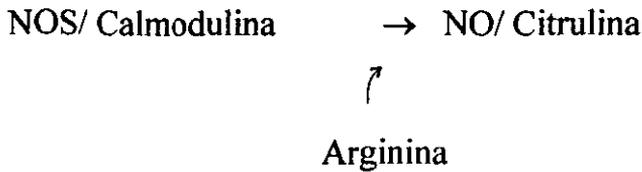


Figura 2.-La forma constitutiva, se une la NOS a la Calmodulina, produciendo NO y Citrulina.

- 2) Para la forma inducible el mecanismo es semejante, cumpliendo con la calmodulina dentro de condiciones normales, que activa a la enzima por estimulación de calcio independiente introducido a la célula. La enzima es inducida después de la activación en macrófagos, células endoteliales, y a través de citocinas y, una vez expresada, sintetiza NO por un periodo largo de tiempo. Además, ésta enzima es citosólica, Ca^{+2} independiente y requiere de tetrahidrobiopterina tal y como otros cofactores, y ésta inducción es inhibida por glucocorticoides. (Stephen Archer, et al. 1993, S. Moncada, et al. 1991).

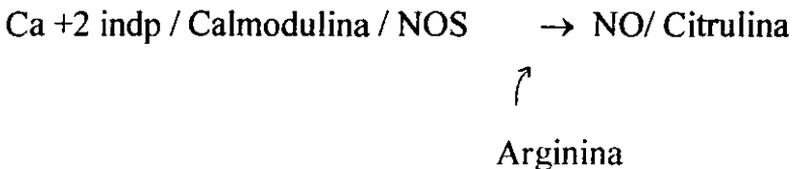


Figura 3.- La forma inducible, se acopla la NOS y la Calmodulina en condiciones normales enzimáticas por estimulación de calcio independiente (introducido a la célula).

Se puede encontrar ésta forma en las células inflamatorias (después de la estimulación con citocina o lipopolisacáridos). Y en el caso de la síntesis neuronal; se relaciona cuando el glutamato se une con el receptor N-metil D-aspartato (NMDA). El glutamato causa transmisión sináptica a receptores de NMDA por operación de canales de ion que promueven el movimiento de calcio desde el exterior al interior de las neuronas. Esta unión estimula la entrada del calcio a la célula uniéndose el calcio a la Calmodulina, el cual

activa a NOS que convierte a la arginina en NO y Citrulina, realizándose éste proceso en un tiempo de milisegundos. (Solomon H. et al. 1992). Aunque también la arginina puede estar sintetizada a partir de Citrulina, el sitio donde se produce con mayor eficacia es en el riñón. Estudios recientes indican que la Citrulina producida por NOS se puede reciclar para formar Arginina en las células endoteliales. (Guoyao W. V. et al. 199).

La conversión de L-arginina a NO es específica, por un número de análogos de L-arginina, incluyendo en ésta D-arginina, no siendo sustrato. Además, ésta se basa en que la relación de NO de las células endoteliales en cultivo puede estar inhibida en una manera enantioméricamente específica por L-NMMA un inhibidor de la generación de NO_2^- y NO_3^- y citrulina de L-arginina en macrófagos.

En el endotelio homogenizado se forma la citrulina a partir de la L-arginina por un mecanismo en el que la forma reducida del nicotinamidoadenin dinucleótido fosfato (NADPH), transporta electrones de un alto potencial al O_2 a través de una cadena de transporte electrónica, (los electrones de alto potencial derivados de la oxidación de las moléculas combustibles pueden ser utilizadas en la biosíntesis que requieren poder reductor). En el citoplasma de las células del endotelio se reduce la arginina por cambio aniónico, donde se incrementa la L-arginina dependiente en el GMPc, en el cual sólo la concentración dependiente requiere al NADPH y es acompañada por la formación de ^3H -citrulina que proviene de la ^3H -arginina. La producción de ^3H -citrulina y el incremento en GMPc se inhiben por L- pero no por D-NMMA. Todos estos datos son consistentes NO y citrulina siendo productos de la reacción enzimática. En suma, la formación de ^3H -citrulina y el incremento de GMPc son inhibidos por Ca^{+2} , indicando que ésta enzima, la cual se llama NO Sintetasa, es Ca^{+2} dependiente. Además, la síntesis de NO por las células endoteliales citosólicas, es inhibida por calmodulina unido con péptidos y antagonistas, se sugiere que la Ca^{+2} dependiente se estimula por medio de NOS en las células endoteliales, que es mediado por calmodulina.

Estudios recientes evidencian que usando $^{18}\text{O}_2$ y Espectrofotometría de masas, se ha demostrado que ésta enzima incorporada al oxígeno molecular dentro de ambos, NO y citrulina, indicando que ésta es una dioxigenasa. (Moncada, et al. 1991).

II.4.-Inhibición de la biosíntesis del óxido nítrico (NO).

La síntesis de NO puede estar inhibida por análogos de Arginina incluyendo NG-monometil -L-arginina (LNMMMA) siendo un inhibidor competitivo de la NOS (Moncada, et al. 1991); en animales la inhibición de la síntesis con LNMMMA conduce a la hipertensión y produce una disminución de la respuesta inmune. La degradación de arginina, dan formación

a la citrulina en células endoteliales es inhibida por L-glutamina, que posiblemente tiene que ver con una serie de aminoácidos que controlan la concentración de Arginina y por consiguiente la producción de NO. (Patrick, et al. 1992, Guoyao W.V. et al. 1992).

La función del EDRF/NO se inactiva por pirogalol o superóxido dismutasa, estabilizada por anion superóxido, e inhibida por oxihemoglobina, ambos EDRF/NO producen incrementos comparables con la acumulación de GMPc en arterias y venas, ésta acumulación de GMPc es inhibida por pirogalol, oxihemoglobina, y azul de metilo. (Luis J. Ignarro, et al. 1987).

En uno de los estudios, se induce la vasodilatación con acetilcolina, que ocasiona un incremento en la excreción urinaria del GMPc, ambos de los cuales proviene por la adición de L-NMMA en la presión sanguínea que es provocada por una disminución en la filtración glomerular.

El incremento de la presión sanguínea inducida por L-NMMA fue acompañada por una disminución en la conducción vascular en el riñón, mesenterio, carótida, y en cuadrantes vasculares. Estos efectos fueron sustentados si la infusión de L-NMMA se continuó por 6 horas, indicando no solo el papel crítico de NO para mantener el tono de dilatación en todas estas instancias, pero solo el factor que el sistema regulatorio en la vasculatura es incapaz de reacomodar el flujo hacia niveles de pretratamiento. Si utilizamos L-NMMA infundida a una dosis relativa, la L-arginina se revierte por constricción de la circulación en la coronaria y una reducción en el flujo coronario. La vasodilatación el cual seguida de la estimulación vagal es solamente sugerida para ser NO dependiente.

El lado arterial libera, en general, más NO que el lado venoso, esto puede ser por acetilcolina, este factor que induce la dilatación en venas y es rápidamente transformada dentro de la circulación. La circulación es atenuada por L-NMMA, por lo tanto, la constricción se aumenta; sugiriendo que el NO es mediador, en menor parte, la dilatación y funcionalmente antagoniza la respuesta vasoconstrictora. (Vallance, et al. 1989, Moncada, et al. 1991).

II.5.-Funciones del óxido nítrico (NO).

Donde se produce el NO, tiene una actividad determinada, lo que induce a un fenómeno específico.

El NO se produce en macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, cerebro y células mesangiales de los glomérulos.

II.5a.- En macrófagos.

Los macrófagos juegan un papel importante en la respuesta inmune. Recientes estudios han encontrado que los macrófagos sintetizan NO y Citrulina de la L-arginina. Esta conversión de arginina a NO se ha implicado en la acción citotóxica de los macrófagos

activados en contraste con células blanco incluyendo; células tumorales, hongos patogénicos, mico bacterias, parásitos intracelulares y células beta del páncreas.

Como un resultado del estudio del metabolismo de arginina en macrófagos es importante el mecanismo bioquímico de células inmunológicas, para la producción de NO. (Guoyao W. V. et al. 1992).

Estudios con ratones, ofrecen bases para pensar que un porcentaje genéticamente determinado da la deficiencia de macrófagos que excretan pocos nitratos, quiere decir, que no producen NO. Por lo tanto se establece una asociación entre la presencia de macrófagos y la de nitratos.

Se aisló un cultivo de macrófagos, se indujo la producción de gama interferón utilizando endotoxina en el cultivo, una proteína moduladora inmune que activa otras células inmunes y que se forma por linfocitos T. Después de ésta infusión, los macrófagos son repentinamente hábiles para la producción de nitratos.

Se aislaron macrófagos que no pueden producir nitratos, cuando el aminoácido arginina esta ausente (normalmente presente en el medio de incubación).

Una enzima especifica en los macrófagos, convierte la arginina dentro de un intermediario químico que da NO el cual es oxidado a nitratos y nitritos.

Un trabajo independiente estudió los macrófagos que eliminan a las células tumorales y se nota que el tumor pierde su capacidad de crecimiento en presencia de los macrófagos cuando la Arginina se adiciona al medio.

Se demostró que el gas de NO es tóxico para las células tumorales ya que los macrófagos activados lo producen y se observó que la inhibición de la enzima sintetizadora de NO, a través de un derivado de L-arginina (específicamente un derivado con un radical metilo), bloquea la formación de nitratos y la destreza que tienen los macrófagos a destruir tumores, por lo tanto producen NO proveniente de Arginina. Cuando los macrófagos son activados por endotoxinas o células T, ellos responden por conversión de arginina dentro de NO. El radical libre tóxico del NO, permite a los macrófagos, destruir bacterias, hongos y células tumorales. El NO producido por macrófagos entra a la célula blanco atacando los citocromos, y así, modifica su metabolismo, el ciclo de Krebs, con los electrones de transición, en las mitocondrias y también desequilibra la síntesis de DNA. (Solomon H. et al. 1992).

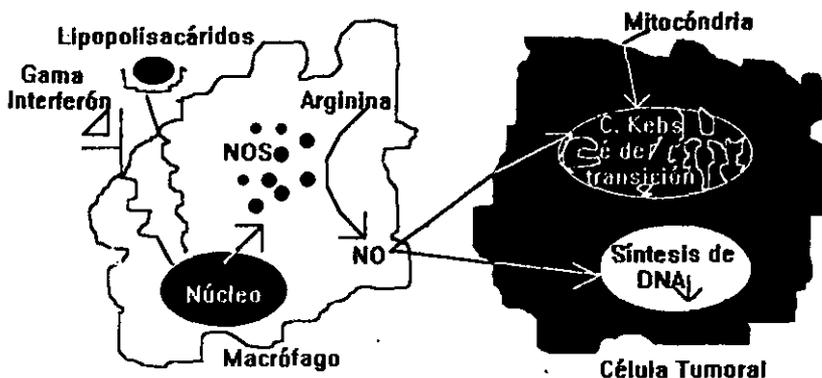


Figura 4.- Síntesis de NO en macrófagos, los cuales atacan por medio del NO a la célula tumoral, afectando la síntesis de DNA y el ciclo de Krebs.

II.5b.-En el cerebro.

La formación del GMPc en el cerebro requiere de arginina; se sabe que el NO es un mensajero molecular o que éste es formado de arginina, por lo tanto, la arginina juega un papel importante en la formación de GMPc en el cerebro, que debe relacionarse con la producción de NO.

Cuando se estimula el tejido cerebral por administración del aminoácido glutamato que es un neurotransmisor, se produce una sustancia con vida corta que tiene propiedades de NO.

Estos efectos mediados por diversos tipos de receptores, uno de los más característicos es el receptor N-monometil-dioxiarginina (NMDA), un aminoácido sintético que actúa selectivamente a éstos subtipos de neurotransmisor glutamato. El receptor de NMDA, es activada por el glutamato abre canales de ion calcio, mediador de la transmisión neuronal, así mandando un impulso nervioso intenso.

Cuando libera grandes cantidades, el glutamato puede causar daño por acción sobre estos canales, por ejemplo; la muerte de neuronas durante un golpe, tal vez proviene de una cascada de glutamato activado en células desprovistas de oxígeno.

En la estimulación del receptor NMDA es producido el NO, en esta producción está implicado como un agente mediador el glutamato, por lo tanto el NO tiene un posible papel en la función sináptica que actúa directamente en el GMPc en los vasos sanguíneos.

Se encuentra la concentración de NO midiendo la actividad de la enzima NOS. La arginina produce NO y Citrulina, en la misma proporción, se monitorea la conversión de arginina a citrulina. En algunos experimentos se midió la Citrulina que es muy elevada comparada con los valores basales, lo que indica que la actividad de NOS se triplicó cuando se agregó NMDA o glutamato. En algunos cortes de cerebro se confirma que NMDA provoca

grandes incrementos en los niveles de GMPc, a las pocas concentraciones como este NOS inhibido.

El NOS se presenta en población discreta de neuronas, en la glándula pituitaria, por instancia, la enzima existe en neuronas cuyos cuerpos celulares yacen en el hipotálamo. Estas neuronas particularmente sintetizan y relacionan la hormona vasopresina y oxitocina en la glándula adrenal, NOS se encuentra concentrada en una red de neuronas que estimula las células adrenales para la producción de epinefrina o adrenalina. En el intestino, la enzima reside en una zona de neuronas en el plexo mesentérico. Estas células nerviosas regulan los movimientos peristálticos. En la corteza cerebral, la enzima aparece en sólo acerca de 2 por ciento de neuronas.

II.5.c.-Como vasodilatador.

El NO da lugar al mecanismo por el cual hace que se dilaten los vasos sanguíneos.

Los vasos sanguíneos son dilatados por algunos neurotransmisores, como la acetilcolina, produciendo relajación vascular a la capa muscular. En contrabalance a estos efectos con otros neurotransmisores, contraen el músculo y constriñen los vasos sanguíneos, como la norepinefrina.

Se piensa que el endotelio está constituido por células lisas en la subfase interior del vaso sanguíneo, inmediatamente adyacente al músculo liso. En una serie de experimentos se demostró que la acetilcolina actúa en receptores localizados en la célula endotelial. Esta acción provoca la liberación de una pequeña molécula que difunde al músculo liso adyacente y lo relaja.

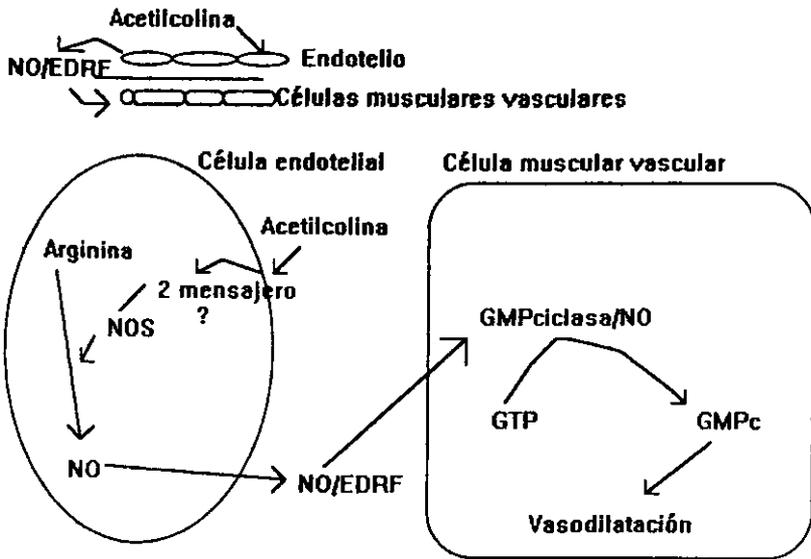


Figura 5.-Mecanismo de la actividad de la acetilcolina y NO/EDRF, en las células endoteliales y musculares vasculares.

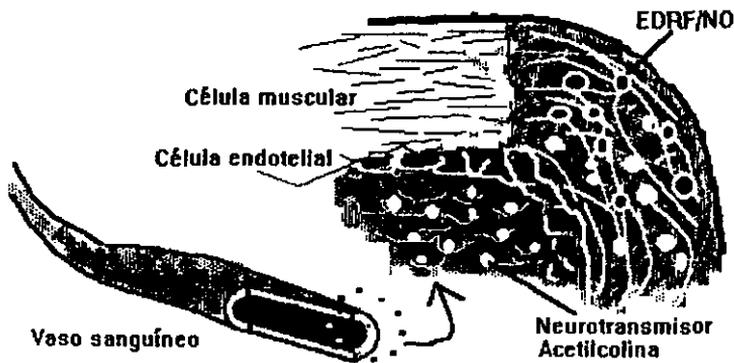


FIGURA 6.- Función de la acetil colina en receptores de células endoteliales La acetil colina actúa en receptores localizados en las células endoteliales activando la NOS y produciendo, por medio de la arginina, NO, que es nombrado EDRF, llegando a la célula muscular vascular y en ella se realiza la reacción por la guanilato ciclasa, la cual tiene un grupo hemo, que tienen una alta afinidad por el NO y al interactuar con este, hay un cambio conformacional de la enzima y esto hace que se forme el GMPC por medio del guanidín trifosfato (GTP), que es el que produce la vasodilatación muscular.

La acetilcolina actúa en receptores localizados en las células endoteliales activando la NOS y produciendo, por medio de la arginina, NO, que es nombrado EDRF, llegando a la célula muscular vascular y en ella se realiza la reacción por la guanilato ciclasa, la cual tiene un grupo hemo, que tienen una alta afinidad por el NO y al interactuar con este, hay un cambio conformacional de la enzima y esto hace que se forme el GMPC por medio del guanidín trifosfato (GTP), que es el que produce la vaso dilatación muscular.

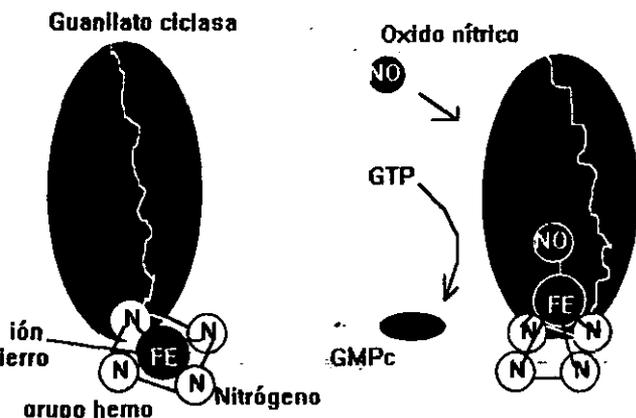


Figura 7.- La enzima guanilato ciclasa tiene un cambio conformacional, en el cual provoca la formación del GMPc, por medio del GTP.

EDRF estimula la formación de GMPc que se considera como segundo mensajero, para la liberación de neurotransmisores y hormonas. En el cual el GMPc se relaciona con la molécula del segundo mensajero AMPc.

Nitroglicerina y nitratos orgánicos son por si mismos inactivos pero una vez en el vaso sanguíneo se convierte metabólicamente a NO produciendo relajación.

El NO relaja al músculo por la estimulación de la formación del GMPc justamente como EDRF.

El EDRF estimula la relajación de las células endoteliales y monitoreando estos efectos realmente en músculo liso, se midió químicamente la cantidad de NO relacionado en el endotelio. El endotelio se relaciona con el exceso de acumulación del NO por la relajación de las células musculares adyacentes por lo tanto el NO es un EDRF.

El NO es aparentemente el principal regulador de la presión sanguínea, algunos investigadores, administraron inhibidores de la enzima NOS en animales y humanos. Tal tratamiento provoca un rápido incremento en la presión sanguínea, un incremento más notable que la alteración producida por la ingestión de fármacos, norepinefrina o angiotensina. Cambios en la regulación de NO puede estar asociada con la hipertensión u otras presiones sanguíneas anormales. (Solomon H. 1992).

III.- IMPORTANCIA DE LA MEDICION DEL OXIDO NITRICO (NO).

Las arterias y venas pueden reaccionar con el Factor Relajante Derivado del Endotelio (EDRF) en respuesta a diversos vasodilatadores. compuestos nitrosos, nitrato orgánico, éster de nitrito y nitrito inorgánico que causan relajación vascular en el músculo liso y acumulación

de GMPc por mecanismo de endotelio independiente y esta acción es atribuida a la relación del Oxido Nítrico (NO).

Por lo tanto es importante determinar si el NO es responsable de la relajación del músculo liso vascular, sacado por EDRF que es una sustancia humoral inestable relacionada con las venas y arterias, que mediante la acción vasodilatadora sobre el endotelio y el NO es un vasodilatador también inestable que se relaciona con fármacos que tienen la misma acción, tales como nitro prusiato y gliceril trinitrato. Así el EDRF y NO poseen varias propiedades químicas y biológicas semejantes. (Luis J. Ignarro 1987).

La respuesta hemodinámica renal a la infusión. de aminoácidos, se ha empleado como una prueba eficaz para el análisis de la reserva funcional. Se desconocen los mediadores humorales de esta respuesta y entre otros, el NO parece tener una participación decisiva en modelos animales. En el hombre, el análisis es complejo por las dificultades para medir de manera confiable al NO y a sus productos finales, los nitritos y nitratos. El reconocimiento del NO como EDRF ha motivado un rápido crecimiento en el número de trabajos sobre su actividad bioquímica y efectos fisiológicos. Los métodos de detección empleados son muy variados, incluyen desde electrodos específicos, hasta quimioluminiscencia. Todos ellos requieren acidificación de las muestras para precipitar proteínas y para reducir nitratos y nitritos, por ser este último el que se detecta. Sin embargo, la acidificación puede sobrestimar hasta siete veces la cantidad de nitritos y nitratos por lo que la detección sin acidificación es una necesidad.

IV.-METODOS UTILIZADOS PREVIAMENTE PARA LA MEDICION DEL OXIDO NITRICO (NO)

La importancia de medir óxido nítrico (NO), da lugar a encontrar un método eficiente que identifique y cuantifique el NO. Para esto, se ha visto que se han desarrollado una variedad de métodos con sus características propias, buscando ser el método óptimo para la medición de dicho compuesto. En éstos métodos que a continuación se detallan, mencionando sus características, los cuales los dividen en métodos de medición directa y medición indirecta, ya que el NO tiene un período de vida muy corto y por lo tanto dificulta la medición directa, pero a pesar de eso, la mayoría de los métodos aquí mencionados realizan la medición directa, los cuales requieren de ciertas condiciones que se tratan a continuación: Para cualquier método utilizado en la determinación de NO, es necesario tener una solución de NO blanco o de referencia, llamado NO calibrado y a continuación se menciona su calibración:

Por acidificación de NaNO_2 (NO_2^-).

Él NO se prepara comercialmente por oxidación de amonio a 500 °C. sobre platino, pasando corriente eléctrica y así eliminando el oxígeno.

Algunas compañías tienen pequeños cilindros graduados con concentraciones determinadas de NO. para su calibración más verídica del ensayo.

La estandarización del NO por diluciones de la solución saturada del NO; se prepara la solución saturada de NO 3mM. con agua bidestilada fría con Helio durante 3 min. removiéndose el oxígeno, y se guarda en cilindros de vidrio sellados.

USO DE AGENTES REDUCTORES Y ACIDIFICANTES.

Para evitar la reacción NO^- , NO_2 , NO_3 en presencia de oxígeno, los agentes reductores pueden ser Na, K que son reductores fuertes y dan un alto nivel de NO por quimioluminiscencia. En el ensayo de diazotización es obligatorio el ácido y en quimioluminiscencia es opcional el agente reductor.

*Estos agentes hacen que varíe la producción de NO real, el cual es cuando se duda en la detección.

IV.1.- Métodos de medición directa.

1a. – Ensayo de quimioluminiscencia.

Consiste en introducir ozono en una cámara de reacción, producido por un generador de O₃, que al entrar a la cámara interactúa con el NO de la muestra, el cual emite una señal que es detectada por el tubo foto multiplicador (FMP) (20-1000 pmol.). Antes de hacer funcionar la cámara, se purga con Helio (He), para que no haya una posible contaminación en la reacción.

Se calibra usando el FMP contra la concentración conocida del NO, que se obtiene el NO de referencia como antes se mencionó.

Su sensibilidad es de 10⁻³ a 10⁻¹²M de NO. No es afectada por agentes reductores ni acidificantes. La muestra debe ser acidificada o reducida fuertemente, y en el caso de los modelos biológicos la señal determinada, no es posible confiar en un resultado verídico.

La fase gaseosa debe interactuar con el ozono, para esto se requiere que la sustancia tenga insaturación o un grupo fuertemente polar y para que el ozono reaccione deben ser muestras pequeñas e insaturadas (como las aminas) y el NO cumple con esta condición. (Stephen Archer 1993).

IV.2.-Métodos de medición indirecta.

2a. – Ensayo de diazotización.

Para que se utilice éste ensayo, también se usa NO de referencia para estandarizar.

Se lleva a cabo éste ensayo en dos pasos: La observación de la aducción de nitroxidos y el ácido sulfanílico que interactúa con N(l-naftil)etilendiamina. La muestra se deposita en un vaso con HCl 4N, se toma una alícuota y se deja incubar durante 10 min. con la mezcla de HCl 2N y ácido sulfanílico; se agrega N(l-naftil)etilendiamina dejando 30 min. en reposo. Posteriormente se mide en espectrofotómetro a 548 nm. El cálculo es por comparación de cambios observados en la DO de la muestra y la calibración.

Los metabolitos medidos son Oxido Nítrico/Factor Relajante Derivado de Endotelio (NO/EDRF), producidos por la estimulación del cultivo de células endoteliales del anillo aórtico.

Aunque el oxígeno es biológicamente inactivo, llega a encontrarse en la solución en muy baja concentración, pero como el ensayo tiene un pH ácido el oxígeno se combina para formar NO sin ningún problema. La sensibilidad es aproximadamente 10⁻⁷-10⁻⁶M de NO.

Este método, no es selectivo para los NO₂ / NO₃, que provienen del metabolismo de NO, por que también son detectables otros compuestos relacionados, tales como N-nitrosamina y nitrosotioles.

Para propósitos experimentales, la solución de NO estandarizada, comúnmente es preparada por burbujeo a solución acuosa con varias concentraciones de NO. La solución de NO es preparada dentro de condiciones anaerobias usando agua degasificada. El oxígeno presente en trazas, puede oxidar el NO disuelto en el agua, lo que ocasiona que el NO reacciona con el oxígeno, en soluciones acuosas produciendo N_2O , NO_2 , N_2O_3 , y posiblemente otros productos no identificados, algunos de los cuales pueden tener propiedades vaso activas o sus productos forman NO. Un método químico que selectivamente detecta NO de otros compuestos relacionados en solución, es invariable. Por lo tanto, el uso de un ensayo químico no específico para la identificación de NO y en la comparación de NO con EDRF puede no ser apropiado por causa de la suposición. Por consiguiente, la falta de especificidad de ésta técnica, es pobre, y la concentración de NO en solución sólo puede estar estimada. (Stephen Archer 1993).

PREPARACION DE LA SOLUCION DE NO Y NO_2

La solución salina acidificada (9mg/ml de NaCl, 0.1mM. de HCl, pH 4), se deoxigena por burbujeo con 100% de nitrógeno por un mínimo de dos horas, la solución es deoxigenada agregando a un tubo vacutainer (100x13mm.), para evitar que el gas se oxide se utiliza argón al 100% durante 15 seg, se gasifica por un minuto con 100% de nitrógeno y mientras el tubo es puesto en hielo. La solución de NO es preparada por tres caminos diferentes:

- 1) Por gasificación continua de ácido salina deoxigenada con NO por 30 min. (NO/X).
- 2) Por inyección de NO dentro de la solución salina en una relación en la dilución equimolar de NO en la solución, usando gas comprimido con jeringa.
- 3) Por inyección de NO dentro de un tubo completamente lleno con solución salina en una relación en la dilución equimolar de NO en la solución, el cual aproximadamente la solubilidad es constante de NO en agua a una atmósfera y 0°C (7.38 ml/100ml).

Se prepararon soluciones de NO en tubos vacutainer, usando gas comprimido con jeringa, que están completamente llenos con solución salina deoxigenada, por lo tanto, las diluciones de la solución normal fueron preparadas en tubos conteniendo 5ml. de solución salina deoxigenada y un espacio muerto de 3ml de nitrógeno al 100%. La dilución subsecuente se almacena en hielo y es usada dentro de 2 a 3 horas. En algunos experimentos, el efecto de cambio de la duración de NO gasificado por solución salina en la relajación vascular y absorbancia espectrofotométrica realmente fue checado por solución normal y dilución de NO_2^- .

PARA ELIMINAR NO DE LA SOLUCION USANDO ARGON

Para determinar invariablemente, el NO o alguna otra sustancia gaseosa no desconocida, disuelta en la solución NO, que es responsable para la relajación vascular y/o el material de detección por absorbancia a 548 nm., el NO fue volatilizado de las diluciones, solución normal por dilución gasificada vigorosamente con argón al 100% por 30 min. No se permite la entrada de oxígeno en los tubos que contienen NO durante el proceso y los tubos son amancebados en hielo.

2b. -Ensayo espectrofotométrico con metahemoglobina.

La hemoglobina comercial que se adquiere para el análisis contiene 50-95% de meta hemoglobina como contaminante, por lo tanto, se debe de reducir y lo que se utiliza es ditionita, una vez reducida se reoxida a meta hemoglobina durante su análisis. Otra forma para la obtención de la meta hemoglobina, es por medio de la purificación de la mezcla por cromatografía en gel usando la columna de Sephadex.

El NO es detectado por cambios característicos del pico de DO de la hemoglobina leída a 433-406 nm. El umbral de detección del NO es 1M. La acumulación de oxihemoglobina no es un problema ya que, la hemoglobina tiene una alta afinidad a NO.

Una de las desventajas de éste ensayo es que tiene un rango amplio en el espectro, y no tiene una longitud de onda específica, lo que disminuye su sensibilidad.

No es adecuado para éste ensayo acidificar la muestra. La meta hemoglobina es relativamente estable. En un experimento la síntesis de NO no puede medirse continuamente con éste ensayo. (Stephen Archer 1993).

REACCION ENTRE HEMOGLOBINA Y EDRF/NO

Una solución de oxihemoglobina 5 μ M en medio de krebs-bicarbonato, se preparó en un buffer tris de 25 mM a pH 7 con HCl (4 ml) y se observa la DO a 25°C en condiciones atmosféricas, antes y después de la adición de NO. El NO causa un cambio característico en el pico de la DO de hemoglobina de 433nm a 406 nm.

En ensayos biológicos como células de endotelio aórtico, se agregó 3 ml de oxihemoglobina a 6.25 μ m, en ausencia y en presencia de un ionóforo de calcio A23187 1 μ M. Después la solución se mezcló lentamente por 90 seg. a 25°C. El líquido libre de células se aspiró con una pipeta pasteur con capacidad exacta que contiene una tela de nylon nytex, que excluye a las células, transfiriendo a una cubeta y midiendo la DO. El oxígeno atmosférico no interfiere apreciablemente con la estabilidad de cualquiera de los dos, deoxihemoglobina o nitrosilhemoglobina, por lo cual no es significativa la cantidad de oxihemoglobina. (Louis J. Ignarro 1987).

2c. -Ensayo con microelectrodo.

Hay dos métodos amperométricos disponibles para la medición de NO en tejidos intactos y células simples.

Se modificó un micro-electrodo de oxígeno, éste se selló con fuego 150-250 μM ., con una goma delgada de cloropreno permitiendo así solo el paso de gases de peso molecular bajo. Por introducción de un cátodo de platino dentro de la pipeta y manteniendo un voltaje positivo. Permitiendo la detección, siendo el gas oxidado, lo que permite la detección al electrodo de superficie, la pipeta se llena con NaCl 3mM y HCl 0.3 mM a pH 5 y un alambre de platino fue cubierto con teflón, puesto tan cerrado como sea posible por la membrana.

Usando éste electrodo se ha medido NO en tejido cerebral de ratón que es producido por estimulación eléctrica de la materia blanca. La sensibilidad del electrodo para medir NO es de 10^{-8} M con un tiempo de respuesta de segundos. Esta técnica puede ser utilizada en la medición de NO en células aisladas, en cultivo e insitu. (Stephen Archer 1993).

2d. -Método de stalnton.

Es un sistema automatizado con la ayuda del Cromatógrafo Líquido de Baja Presión (LPLC) utilizando el método de Griees para el análisis de nitrato, vía reducción con alta presión en una columna de cadmio (Cd), utilizando como muestra: orina, saliva, plasma desproteinizado, jugo gástrico y leche. Con este sistema se puede determinar nitratos y nitritos (NO_2 y NO_3) con un límite bajo de detección de 1.0 nmol de NO_2 o NO_3 por ml

El sistema permite la reducción cuantitativa de NO_3 y automáticamente elimina interferencias de otros compuestos presentes normalmente en orina y otros fluidos orgánicos.

El reactivo de Griees, sólo detecta NO_2 por lo que los NO_3 para que sean detectados tienen que ser reducidos a NO_2 .

En éste método, se usa Cd para reducir el NO_3 a NO_2 , en un sistema automatizado. La reducción de NO_3 a NO_2 puede realizarse en diferentes caminos: la reducción química con catalizadores metálicos, reducción enzimática con NO_3 reductasa aislada con niacin adenin dinucleótido reducido (NADPH) como electrón donador o bacterias con formato como electrón donador. Las muestras son proporcionadas por dilución con agua destilada. Se trabaja, éste método, diluyendo la muestra de orina en agua 1:100.

Para las muestras altamente diluidas, como las de orina con un volumen grande de fase móvil que recorre por la columna con la muestra. La eficiencia de la reducción de NO_3 a alta presión, se da por la columna que es empacada con finas partículas de Cd que permiten el paso de 99% +/- 5% de NO_3 agregado a la orina, por lo tanto la interferencia queda eliminada.

El NO_3 en la muestra, se reduce al ser introducida a través de la columna de Cd, quedando como NO_2 , el cual reacciona con el reactivo de Griess, y al reaccionar, da como producto una solución de color púrpura, el color es desarrollado por un baño de agua a 60°C y enfriado por otro baño de agua a 0°C , posteriormente se detecta en el espectrofotómetro u.v/visible a una absorbancia de 546 nm. El volumen mínimo de la muestra, para el análisis automático, es de 0.3 ml

El reactivo de Griess, consiste en preparar dos soluciones, una es N(1-Naftil) etilendiamina al 0.1% en agua destilada con HCl y la otra es sulfanilamida (ácido sulfanílico) al 1% en H_3PO_4 al 5% concentrado, se mezclan las dos soluciones al mismo tiempo dentro de 12 horas, guardada en frío (cada parte puede estar almacenada en refrigeración por dos meses).

La fase móvil, buffer, es NH_4CL al 5% acuoso, ajustado el pH con borato de sodio (puede estar almacenado en refrigeración por varios meses). Ambos Reactivos son degasificados antes de usar dentro de un vacío parcial a temperatura ambiente por varios minutos.

La columna de reducción es de teflón para alta presión, empacada con Cd plateado y con una solución de CuSO_4 al 5%. Su tamaño es de 10 mm de largo y 4 mm de diámetro. Esta columna no retiene NO_2 o NO_3 , la cual sirve como limpiador, atrapando sustancias de interferencia que provienen de la muestra biológica, y así, la columna de Cd protege al sistema. El rango del estándar de NO_2 y NO_3 es de 5 a 50M, que son analizados diariamente para checar la eficiencia de la columna utilizando un curva de recuperación. La muestra de la orina obtenida más NO_3 estándar $10\mu\text{M}$ son analizados periódicamente para determinar la productibilidad del sistema. La reducción de NO_3 a NO_2 en la columna de cadmio es el 100% eficiente. Con los resultados obtenidos indica que no hay ninguna interferencia de sustancias en la orina ni un aumento en la reducción cuantitativa de NO_3 . (Green, L.C. 1982).

2e. -Espectrofotometría de masas.

Se atrapa el NO como nitrosotioprolina por burbujeo. Se usa solución acuosa degasificada de tioprolina. La nitrosotioprolina es extraída con acetato etílico. Es desecada y derivatizada por N-metil-(terbutildimetil-silil) trifluoracetamino en acetonitrilo.

La muestra se sitúa en la interfase de la columna CP-sil 5-CB con un espectrofotómetro de masas, operando en el modo de ionización, químicamente positivo con isobutano.

Tiene un tiempo de retención de 4.75 min. Es más sensible que el ensayo de quimioluminiscencia. (Stephen archer 1993).

3. – Fundamentos de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC.

El cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) lleva acabo la separación y la identificación de sustancias líquidas que consiste en pasar la solución, a través de una columna con la ayuda de alta presión, éste procedimiento se describe a continuación:

Esta constituido por un inyector UK6, una columna IC-Pak aniónica, un espectrofotómetro waters 484 a 214 nm y como registrador se utilizó una computadora NEC con un analizador de datos máxima 220. Para encontrar la curva de control estándar en el rango adecuado, para la lectura de los resultados con la concentración apropiada, y leyendo NO_2 y NO_3 simultáneamente.

La muestra se deposita en el inyector y es arrastrada por la fase móvil (en éste caso se utiliza LiOH a concentración 1.8 mM) la cual pasa directamente hacia la columna (de intercambio iónico IC-Pak AHR Waters) de 7.5 cm de longitud, a una velocidad de flujo de 0.9 ml/min. con presión de 1000 psi. Concluyendo en un detector UV/Vis, leído a una longitud de onda de 214 nM.

Los nitratos y nitritos son retenidos por la electronegatividad de la columna. La fase móvil, que en este caso se utiliza LiOH que presenta una molaridad pequeña, la cual permite el arrastre de los nitratos y nitritos en el tiempo adecuado, para su posterior detección, y así poderlos apreciar en el cromatograma.

Una característica peculiar de la fase móvil, es ser muy inestable en presencia del medio ambiente, por lo que se requiere de extrema seguridad para su preparación y su utilización. Debe ser preparada con agua HPLC (filtrar y degasificar después de diluir la sal de LiOH en el agua desionizada). Y para poder conectar al sistema la fase móvil, se debe evitar su oxidación con la presencia de humedad del medio ambiente, por lo que se aconseja ajustarle una trampa de ascarita para la desecación. -

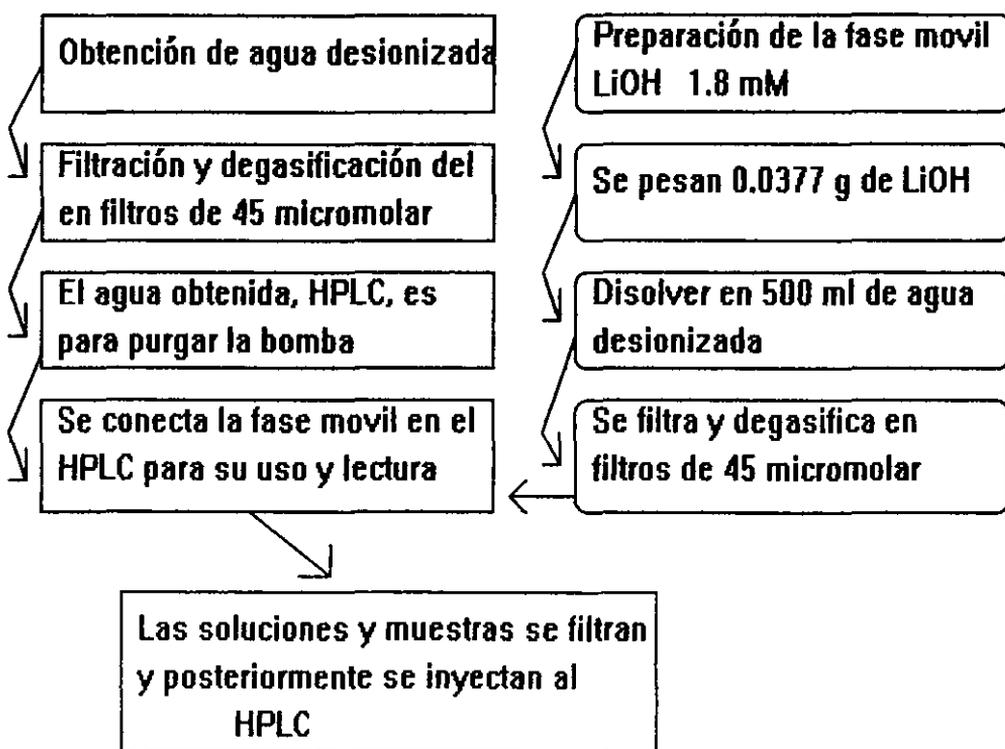
Anteriormente se ha utilizado un método similar utilizando HPLC para la medición de NO_2/NO_3 para determinar la presencia de NO en el agua potable, medio ambiente, leche y otros medios (con sus respectivas condiciones de cada sistema). Este método no había tenido éxito en su medición para fluidos biológicos, por causa, de que las muestras requieren desproteínización, y por éste hecho se acidifican, resultando no factible para éste método.

Para que el nuevo método propuesto sea confiable, se requiere de ciertas pruebas de estandarización y control de calidad del material propuesto para el funcionamiento de dicho método. Por lo que es importante encontrar el rango de la curva de concentraciones de las soluciones tanto de NO_2 y NO_3 . Confirmar la calidad del agua HPLC, de los filtros, utilizados. Encontrar un control interno para las soluciones y muestras apropiado con su concentración más factible. Tener el control de la pureza de la muestra desproteínizada, evitando la presencia de partículas, péptidos proteínas en las muestras.

ACTIVACION DEL HPLC:

1. -Se conecta el aparato y se enciende.
2. -Se purga el sistema: (obteniendo agua HPLC y bombeando el agua al sistema, para eliminar la posible existencia de burbujas en el HPLC.
3. -Preparación de la fase móvil (LiOH 1.8 mM).
4. -Cambiar el agua HPLC por la fase móvil al sistema.
5. -Se pone en línea la columna en el HPLC.
6. -Activado el sistema, queda disponible para la inyección de las muestras previamente filtradas.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA MEDIR LAS MUESTRAS EN EL HPLC:



FUNDAMENTO DEL NUEVO MÉTODO

Se ha hablado de las características y condiciones de los métodos establecidos anteriormente que son de forma directa o indirecta los cuales requieren de la acidificación para la eliminación de proteínas, o la reducción de los nitritos y nitratos para obtener NO y poder ser medido. Estas condiciones las hemos contemplado en el trabajo, las cuales pretendemos eliminar y medir los metabolitos del NO que son el nitrito y el nitrato en el HPLC. Este aparato de medición ofrece veracidad y confiabilidad, a la vez de requerir un cierto cuidado especial para la columna utilizada, tal columna no debe de estar en contacto con soluciones ácidas y este es un punto importante, por que se pretende desproteinizar las muestras por medio de centrifugación a 6000 rpm, sobre membranas de polisulfona y por adsorción en silanos C-18. Una vez obtenida la muestra libre de contaminantes, se procede a inyectar 100 μ l en el HPLC. Para el control de la cantidad de la muestra procesada y obtenida, se le adiciona a cada muestra 50 μ l de NaBr como estándar interno y poder hacer los ajustes requeridos.

Los resultados del proceso de extracción conllevan a la detección, determinación y conversión de tales resultados, por lo que se da la explicación de como ocurre el mecanismo de detección. La muestra pasa a través de la columna, en la que los nitritos y nitratos son retenidos por la carga de dicha columna y son arrastrados gracias a la fase móvil llevando los compuestos en su respectivo tiempo al detector UV/Vis, los cuales se leen a una longitud de onda de 214. El detector recibe la señal en densidad óptica (DO), la cual es emitida a la computadora como voltaje, por lo tanto, la unidad en volt equivale a una unidad de DO. Mientras que el compuesto en cuestión se está detectando, en el cromatograma va apareciendo la curva dependiendo del aumento y la disminución de la concentración de dicho compuesto, hasta que desaparece. Por lo tanto, el área bajo la curva del cromatograma es el resultado de la concentración obtenida, haciendo la comparación y determinar la variación y la importancia de los de las muestras inyectadas en el (HPLC). El ion bromuro (Br^-) es utilizado como estándar interno, dando el control y manejo de la muestra en el proceso de extracción, por lo tanto, la cantidad que se encuentra en la muestra de NO_2 y NO_3 puede ser totalmente monitorizada por el ion bromuro (Br^-), ya que lleva el mismo proceso de los iones de NO_2 y NO_3 , por lo que se le adiciona el Br^- a la muestra.

V.-MATERIAL Y EQUIPO.

1. –Equipo de medición

- Cromatógrafo de alta resolución [HPLC] con bomba Waters 510.
- Columna IC-Pak Aniónica HR.
- Precolumna IC Pak aniónica.
- Detector espectrofotométrico Waters 484 -214nm.
- Inyector U6K Waters capacidad 250 μ l.
- Balanza analítica, sensibilidad de peso 0.0001g.
- Micropipetas Hamilton, capacidad de 100 y 50 μ l.
- Pipetas Rainin digitales de 25, 250 y 100 μ l.
- Puntas para micropipeta.

2. –Equipo para purificación de las muestras.

- Ultrafree-mc 5,000 peso molecular, no estéril [negro].
- Ultrafree-mc 30,000 peso molecular, no estéril [verde].
- Filtro Millex Durapore estéril con poro de 0.45 μ m
- Sep Pak C18 Cartridges para extracción de fase sólida.
- Bomba para filtración Millipore.

3. –Reactivos.

- LiOH 1.8 mM 500 ml como fase móvil.
- Soluciones de NO_2/NO_3 a concentraciones 1mM, 1 μ M, 1nM / 1ml y 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 M/ml. Sales de LiNO_3 , AgNO_3 .
- Medio de cultivo
- Agua HPLC.
- Reactivo ABC (Azul brillante de Coomassie. G-250 100mg, etanol al 95% 50ml, ácido fosfórico al 85 % p/v 100ml).

VI. –METODO

1. – Estandarización del método.

Se realizó una curva tipo considerando las concentraciones reportadas en las muestras biológicas, y así tener una curva de concentración dentro de los valores reales. Un inconveniente es que también se encuentran otros iones que interfieren en la determinación de NO_2/NO_3 , y estos pueden modificar la lectura exacta del experimento como es el caso del ion cloruro que puede ser observado a la misma longitud de onda adecuada, como interferencia en la determinación de NO_2/NO_3 en el cromatograma.

1.a. –Determinación de longitud de onda (λ) adecuada para NO_2 y NO_3 .

Para identificar inicialmente los iones de NO_2 y NO_3 en el espectrofotómetro U.V, se buscó a través de un barrido la longitud de onda más adecuada en la que pudiéramos ubicar y trabajar posteriormente la determinación de NO_2 y NO_3 .

Para la identificación de la λ , se prepararon soluciones de NO_2 y NO_3 con las siguientes concentraciones: 1nM., 100nM., 500nM, 1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM por ml, las cuales fueron leídas en el espectrofotómetro U.V. a diferentes λ para comparar y seleccionar la más adecuada.

1.b. –Identificación de interferencia de contaminantes.

En muestras biológicas se pueden encontrar iones que pueden interferir con la determinación de NO_2/NO_3 , y estos pueden ser iones diferentes que pueden ser Na, K, Ca. Por lo tanto se prepararon soluciones de las siguientes sales: LiNO_3 , AgNO_3 , NaNO_3 , NaNO_2 ; cada solución se preparó con las siguientes concentraciones: 1nM., 100nM., 500nM., 1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 1mM. Y estas concentraciones de las soluciones se leyeron en espectrofotómetro ultravioleta a 214nm que es la λ óptima para NO_2/NO_3 y comprobar si hay o no interferencia con los resultados de las muestras biológicas que pueden contener los iones antes mencionados.

1.c. –Confiability del agua HPLC utilizada en el proceso.

Es importante tomar cuenta que el agua utilizada en éste trabajo debe ser estrictamente pura, por lo tanto se realiza un proceso para la obtención del agua a la que llamaremos agua HPLC, (Agua HPLC = Agua obtenida de un desionizador de osmosis inversa, que posteriormente es desionizada, después filtrada en poro de 0.45μ y por último degasificada).

Para confiar en el agua HPLC como tal, utilizada en todo el proceso de extracción y de inyección, se probaron diferentes tipos de aguas que provienen de: a) un desionizador, b) un Milli-Q-desionizador, c) un desionizador de osmosis inversa, d) y por último, el agua que siempre utilizamos, que es agua obtenida de un desionizador, pasa por osmosis inversa, un desionizador y después degasificada. Ya que alguna de estas fuentes podría estar contaminados con los analitos de interés, los cuales pueden impedir que se lleve a cabo el proceso y una lectura veraz. Posteriormente se inyectaron y se leen en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC). Y así poder comprobar la pureza del agua de la que siempre se ha trabajado; considerándola factible para nuestra finalidad.

1.d. –Curva tipo.

Es necesario tener una referencia de la concentración de los iones NO_2/NO_3 . Por lo que se realizó una curva tipo en la que tendremos una escala de concentraciones definidos de dichas soluciones de NO_2/NO_3 . En esta curva tipo se observa la concentración definida y la respuesta detectada por el espectrofotómetro del HPLC, a cada solución utilizada en ésta determinación se adiciona un estándar interno que debe ser un anion seleccionado (el ion bromuro), el cual su tiempo de retención se encuentra entre la de NO_2/NO_3 , además el estándar interno sirve para asegurar la variación de la concentración a través de todo el proceso de extracción de NO_2/NO_3 de muestras biológicas.

La curva tipo de la mezcla de $\text{NO}_2/\text{NO}_3/\text{Br}^-$ tiene las siguientes concentraciones, cada una en $\text{nMol}/300\mu\text{l}$: 4.5, 7.5, 15, 30. Se decidió tomar ésta molaridad por que en las muestras biológicas se encuentran entre estos valores

2. –Preparación de las muestras biológicas para su inyección en el HPLC.

Para determinar toda muestra inyectada en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), es esencial que estén libres de contaminantes, siendo péptidos y proteínas, frecuentemente localizados en muestras biológicas, utilizadas en éste trabajo como son: plasma o medio de cultivo. Dichas muestras deben de llevar un proceso de purificación y para esto es necesario comprobar que queden eliminados los contaminantes (péptidos y proteínas). El proceso de purificación se da con la extracción de las diluciones correspondientes con filtros Millipore de 0.45 μm de poro y posteriormente se inyectan en el (HPLC).

Para comprobar la purificación de las muestras, se cuantificaron las proteínas en cada etapa de la extracción utilizando el método Bradford y su posterior lectura en espectrofotómetro visible.

También las muestras se pueden contaminar en el proceso de purificación con iones que modifiquen la veracidad de los resultados, para esto se comprueba la pureza de los ultra-free y Sep-Pak que se utilizan en éste proceso.

2.a. –Precipitación de proteínas por medio de ácidos.

Las proteínas se precipitan con soluciones ácidas, lo cual esto sería otra opción para eliminar péptidos y proteínas, y la muestra esté limpia de contaminantes, pero ésta solución ácida debe tener tal concentración para que no afecte la columna del HPLC. Y con estas condiciones se probaron diferentes ácidos a diferentes concentraciones de tal modo que precipiten las proteínas y no afecte la funcionalidad de la columna.

2.b.– Proceso de purificación de NO_2/NO_3 de muestras biológicas por tamices moleculares (Uf), por fase reversa (Sep-Pak).

Es importante confiar en que los filtros utilizados en el proceso de extracción, no contaminen las muestras ya que estos pueden contener en su estructura NO_2 y NO_3 , por lo que se hacen varias pruebas para la purificación de las muestras biológicas (medio de cultivo y orina).

Para eliminar péptidos y proteínas mayores de 5000 de peso molecular, se utilizan filtros Ultra free (UF) de 5000 NMWL y para eliminar péptidos pequeños menores de 5000 de peso molecular, se utilizan Sep-Pak C18.

A 1ml. de muestra agregamos 50 μl . de bromuro (Br-) de un μM . de concentración, como estándar interno. Por lo tanto al extraerse la muestra con el bromuro (Br), controlamos cuanto realmente recuperamos o se pierde de la muestra y se calcula la verdadera concentración de NO_2/NO_3 . Se homogeniza la muestra con vortexy posteriormente se centrifuga durante 3 min. a 6000 rpm para clarificar la muestra en un prefiltro (filtro rojo).

Se depositan 500 µl de muestra en el filtro ultra free de 5,000 NMWL (filtro negro) para la desproteínización de las muestras, y éste es centrifugado 5 min. a 11000 r.p.m. para separar proteínas de la muestra. Se mide el volumen recuperado del filtrado para calcular la cantidad procesada.

Se utiliza otro Ultra free (UF) adicionándole agua y éste funciona como control, el cual se le sigue el mismo proceso de extracción para hacer la comparación (a este cromatograma se le asignará el símbolo *Cnt* para identificarlo), de las posteriores inyecciones de las muestras obtenidas de: Agua HPLC (*HPLC*), agua del ultra free (*UF*) y agua control (*Cnt*).

En otra de las etapas de purificación, se utilizan cartuchos de Sep-Pak C18 los cuales, son para la eliminación de péptidos pequeños, que puedan afectar la muestra al inyectar (El ultra free permite el paso de péptidos de un peso molecular menor a 5000 por lo tanto es necesario eliminarlos con un Sep Pak), pero se detecto que en el Sep-pak contiene NO₂ y NO₃, los cuales contaminan la muestra procesada. Para éste inconveniente, se lavó con agua HPLC para cada uno de los cartuchos de sep-pak C18 y determinar, qué cantidad de agua es la necesaria para que no contengan contaminantes (NO₂/NO₃): Se activa el cartucho Sep-pak C18 con 10 ml de Metanol HPLC (Reactivo especial por su pureza para el uso del HPLC) y 20 ml de agua HPLC, el último ml de esta agua, se filtra a través de una membrana Durapore, para inyectarlo al cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), y éste es etiquetado (SP20), para la siguiente prueba, se pasan otros 20 ml en el sep-pak y el último ml se filtra en otro Durapore, inyectándolo posteriormente (SP40), y así sucesivamente se pasan 20 ml, se filtran y se determina la curva, y por último se etiqueta de la siguiente manera:

- SP20-lavado con 20 ml de agua HPLC.
- SP40-lavado con otros 20ml, en total 40ml de agua.
- SP60-lavado con otros 20ml, en total 60ml de agua.
- SP80-lavado con otros 20ml, en total 80ml de agua.
- SP100-lavado con otros 20ml, en total 100ml de agua.
- SP120-lavado con otros 20ml, en total 120ml de agua.

Se afora el volumen a 2ml totales de la muestra. Se diluye la solución obtenida 1:10 a causa de que la muestra se obtiene en concentraciones muy altas, y los cloruros pueden enmascarar las curvas de los nitratos y nitritos en el cromatograma. Para clarificar el total de la muestra se pasa a través de membranas Dura-Pore que tienen un poro de 0.45 µm para evitar la contaminación o dañar la funcionalidad del HPLC, al ser inyectadas las muestras en dicho cromatógrafo.

Se toman 100 µl. de la solución obtenida para ser inyectada en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC). y posteriormente leída en el cromatograma.

2.c. –Detección de proteínas en el proceso de purificación por filtración.

En la desproteinización de las muestras, para que no haya interferencia en nuestro análisis, es necesario que se realice un proceso de filtración; para analizar tal proceso, es necesario medir en cada uno de los pasos su grado de pureza e identificar todos los filtros involucrados en el proceso de purificación. Para esto se toma una alícuota de 500 μ l de medio de cultivo y suero al 10% (50ml de medio de cultivo y 5 ml de suero) para filtrar como lo indica el diagrama del proceso; tomando en cada paso de filtración, 100 μ l., de la muestra y se lee en espectrofotómetro visible a longitud de onda de 595nm. Tomando como referencia la curva de purificación del medio de cultivo, y así saber la cantidad de proteínas que permite pasar a través de los ultra-free (filtros).

Esta prueba es importante para determinar la eliminación de contaminantes con el proceso de extracción de las muestras, ya sea medio de cultivo, plasma u orina

Con el método de Bradford se determinan las proteínas y se puede saber qué concentración de proteínas contiene la muestra extraída. Por lo tanto se hace la siguiente curva tipo, con las siguientes concentraciones en μ g/ml: 0, 10, 20, 40, 80, 100 de albúmina. Y posteriormente se hace el ensayo de identificación con dicho método para que a continuación se lean las soluciones en el espectrofotómetro.

*Nota: El método de determinación de proteínas Bradford se explica a continuación:

Reactivo ABC:

Azul brillante de Coomassie G-250 al 0.01%(100mg) se disuelve en etanol al 95% 50 ml y se le añade ácido fosfórico al 85% (p/v), se diluye en agua destilada para completar un litro de solución y por último se filtra en papel Watman No. 1. Se conserva de 4-6 semanas en frasco ámbar.

Ensayo 1:

Para la solución que contenga de 10-100 μ g. de proteínas en 0.1 ml, se pipetea 0.1 ml o fracción y se ajusta a 0.1 ml con el amortiguador apropiado (solución NaCl o PBS). Se añaden 5 ml de reactivo ABC, se lee entre 3 y 30 min. a 595 min.

Ensayo 2:

Microensayo, para la solución que contenga de 1-10 μ g. de proteínas en 0.1 ml. Se pipetea 0.1 ml o fracción y se ajusta a 0.1 ml con el amortiguador, se añade un ml de reactivo ABC y proceder como el método anterior.

Ensayo 3:

Para proteínas de 5-60 μ g. por 0.1ml, se pipetea y ajusta al volumen 0.1 ml, si se necesita, se añade 2.9 ml de reactivo ABC.

2.d. –Interferencia del ion cloruro (Cl^-) con NO_2^-/NO_3^- .

Otro factor que interfiere en la cualificación de NO_2^-/NO_3^- es el ion cloruro (Cl^-) que se encuentra en muestras biológicas y produce un enmascaramiento de los NO_2^-/NO_3^- dentro del cromatograma, observándose un pico negativo del cloruro (ver cromatograma 1d.0). Para esto se decidió hacer una modificación en la molaridad de la fase móvil. Esto se hizo para cambiar los tiempos de retención de cada uno de los picos y separar la depresión del cloruro con los picos de NO_2^-/NO_3^- para que puedan ser percibidas en dicho cromatograma.

3. – Extracción de NO₂/NO₃ en experimentos biológicos.

Después de haber ajustado todo el proceso, tanto de estandarización como de purificación de las muestras requeridas; se procede con las extracciones de medio de cultivo incluyendo la mezcla de los iones: NO₂, NO₃ y Br a diferentes concentraciones.

El medio de cultivo con el que se está trabajando se utiliza en el cultivo de glomérulos, los cuales producen óxido nítrico y éste se metaboliza a NO₂ y NO₃. Por lo tanto se hacen extracciones de medio de cultivo con glomérulos, medio de cultivo sin glomérulos, en donde se han agregado diferentes sustancias que pueden modificar la producción de NO₂ y NO₃ en los glomérulos. Estas soluciones posteriormente se extraen y se inyectan en el HPLC para la respectiva lectura de los valores de NO₂, NO₃ y Br.

3.a. - Experimentos que se utiliza la mezcla de NO₂, NO₃ y Br con medio de cultivo sin rojo de fenol.

En este experimento es importante determinar la variación de las concentraciones de los iones inyectados y presentados en el cromatograma, para esto se hace la dilución de la mezcla de NO₂, NO₃ y Br, que el ion bromuro es el estándar interno, diluido con el medio de cultivo que se prepara sin rojo de fenol. El rojo de fenol (que es un colorante que puede tener el medio de cultivo) el cual provoca interferencia en la lectura las concentraciones de dichas muestras, por el colorante. Por eso se hacen diluciones con las siguientes concentraciones: 4.5, 7.5, 15, 30 nMol/l ml, comparando las soluciones del medio de cultivo con rojo de fenol y sin rojo de fenol

3.b. - Experimento con glomérulos en medio de cultivo.

Con el fin de comprobar la actividad glomerular en presencia de ciertas moléculas, que modifican la producción metabólica de nitritos y nitratos (NO₂/NO₃). Se hace una serie de extracciones con la presencia de diferentes sustancias. A continuación se presentan tres experimentos en las que las sustancias se abrevian como sigue:

Medio de cultivo (MC). Glomérulos (G). Arginina (Arg). L-Monometil-arginina (LMMA). Lipopolisacáridos (LPS). Acetilcolina (Ach). Endotelina (Et).

Experimento 1. -

El cultivo de los glomérulos se dejó 48 horas con las sustancias que se indican a continuación, haciendo el trabajo por triplicado.

Tabla 3b.1.- Diseño del experimento con las siguientes moléculas. Medio de cultivo y glomérulos.

-MC	-MC + LPS
-MC + G	-MC + LPS + G
-MC + Arg	-MC + Ach
-MC + Arg + G	-MC + Ach + G
-MC + LMMA	
-MC + LMMA + G	MC + Et + G

El medio de cultivo (MC) es la prueba basal de todo el experimento, al poner los glomérulos con el medio de cultivo, se espera que aumente en pequeña proporción la producción de NO. El MC con arginina es sustancia comparativa para la prueba del MC con Arg. y glomérulos, el cual en éste debe de haber un aumento más significativo, pues la arginina es la molécula que se requiere para la producción del NO por medio de los glomérulos. La LMMA es inhibidor de la NOS impidiendo la síntesis de NO, por lo tanto la prueba del MC más LMMA es sustancia basal para MC más LMMA y glomérulos, en el que se espera que haya una disminución en la producción del NO. El lipopolisacárido, la acetil colina y la endotelina son estimulantes en la producción del NO por lo tanto se pretende comparar el aumento de la síntesis del NO.

Experimento 2. -

El siguiente experimento se llevó a cabo con las siguientes sustancias, (cada muestra por triplicado). Fueron incubados 500,000 glomérulos en medio de cultivo con CO₂ al 5 %, se dejó en la incubadora durante 48 horas.

Tabla 3b.2.- Experimento 2 con las siguientes moléculas.

1. -MC	5. -MC + Et
2. -MC + G	6. -MC + Et + G
3. -MC + LMMA	7. -MC + Et + LMMA
4. -MC + LMMA + G	8. -MC + Et + LMMA + G

Se pretende comparar la producción del NO del inhibidor LMMA con el estimulante endotelina tomando como basales el MC solo y con la respectiva sustancia sin los glomérulos.

Experimento 3. -

Este experimento se hizo con un millón de glomérulos cultivados en 48 horas. Con las siguientes sustancias:

Tabla 3b.3.- Moléculas del experimento 3.

1. -MC	6. -MC + A23187 + G
2. -MC + G	7. -MC + A23187 + LMMA + G
3. -MC + Arg + G	8. -MC + A23187 + Arg + G
4. -MC + LMMA	9. -MC + A23187 + Arg + LMMA + G
5. -MC + LMMA + G	

En este experimento se pretende comparar la inhibición del LMMA con el ionoforo de calcio A23187.Cuál de los dos es predominante, y también comparado con la arginina que tanto el A23187 como la Arg son estimulantes por la producción del NO.

3.c.- Determinación de NO₂ y NO₃ en orina de voluntarios sanos.

Se recolectó la orina de pacientes sanos en un tiempo determinado, después de haber ingerido una cantidad de proteínas, y posteriormente, determinar la elevación en la producción de NO₂ y NO₃ por el metabolismo renal. Haciendo el proceso de filtración las muestras. El orden es el siguiente:

Tabla 3c.- Orden del experimento con la muestra de orina.

AB	AE	EE	FL	GL	GH	IE	RA
3, 8	3, 8	3, 8	3, 8	3, 8	3, 8	3, 8	3, 8

Nota: Las letras significa la identificación del paciente y los números 3 y 8 es el número durante el proceso de la infusión de las proteínas; en la muestra 3 es basal y la muestra 8 es donde se ha demostrado el aumento en la filtración renal después de la infusión de aminoácidos.

VII.-RESULTADOS

1. - Resultados de la estandarización del método.

1.a.- Determinación de longitud de onda (λ) adecuada para NO_2 y NO_3 .

Se hicieron varias lecturas a diferentes longitudes de onda de las soluciones respectivas y se encontró que entre 200 a 250 nm hay una elevación en la DO, encontrando la longitud de onda más apropiada de 214 nm, ya que a otras longitudes (200, 250, 300, 350) no se puede determinar un pico máximo de DO, y en ésta longitud de onda se obtuvieron en espectro los resultados correspondientes: (ver tabla y figuras 1a.1, 1a.2):

Tabla 1a. Resultados de las soluciones de NO_2/NO_3 , determinando la longitud de onda de las respectivas concentraciones.

conc	NaNO_3 DO	NaNO_2 DO
1nM	0.042	0.016
100nM	0.024	0.016
500nM	0.026	0.020
1 μM	0.035	0.028
10 μM	0.043	0.060
25 μM	0.136	0.141
50 μM	0.300	0.261
100 μM	0.619	0.494

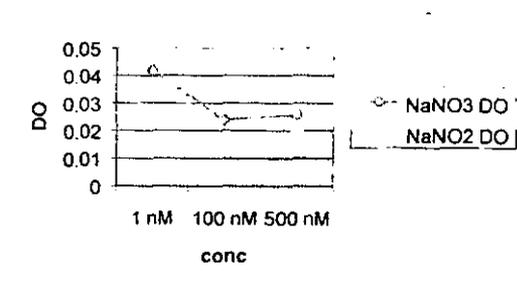


Figura 1a.1 Gráfica de la determinación de la longitud de onda de las concentraciones 1, 100, 500nM.

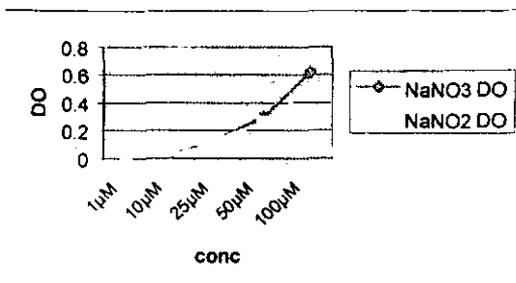


Figura 1a.2.- Gráfica de la determinación de la longitud de onda de las concentraciones: 10, 25, 50, 100 µM.

1.b. Identificación de interferencia de contaminantes.

Se obtienen los resultados de la interferencia de las sales que acompañan al NO₂ o NO₃, en el medio de cultivo. Esto se leyó en espectrofotómetro U.V. con las siguientes concentraciones y resultados obtenidos en densidad óptica a 214 nm: (ver figuras 1b.1 y 1b.2). Observando los resultados se demuestra que no hay interferencia que pudiera estar dada por la presencia de contraiones a la DO analizada.

Tabla 1b.- Resultados de las sales de NO₂ /NO₃ leídos en espectrofotómetro UV a densidad óptica de 214 nm.

CONC	LiNO ₃ DO	AgNO ₃ DO	NaNO ₃ DO	NaNO ₂ DO
1nM	0.001	0.007	0.043	0.000
100nM	0.005	0.005	0.035	0.016
500nM	0.002	0.003	0.016	0.020
1µM	0.001	0.001	0.026	0.011
10µM	0.050	0.059	0.024	0.060
25µM	0.150	0.174	0.136	0.141
50µM	0.301	0.346	0.300	0.261
100µM	0.576	0.680	0.619	0.494
1mM	2.973	2.985	2.954	2.648

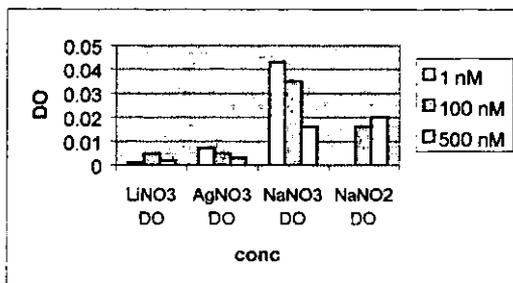


Figura 1b.1.-Gráfica de la interferencia de los contraiones que pueden intervenir en la lectura.

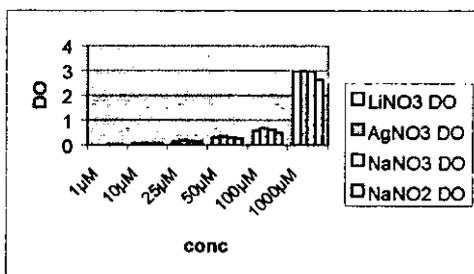


Figura 1b.2.- Gráfica de la continuación de los valores de los contraiones estudiados.

1c. Confiabilidad del agua HPLC utilizada en el proceso.

Al comparar los cromatogramas de las diferentes fuentes de agua que ya se han mencionado, se demuestra que el agua de determinadas fuentes, tiene una variación en la concentración, un aumento en los picos del cromatograma, que se podrían considerar como la presencia de nitratos. Sin embargo el cromatograma en el que se observa una agua de calidad HPLC (que es el agua que se utiliza para la preparación de estándares, muestras y fase móvil, ésta agua es la que se pasa a través de osmosis inversa, un desionizador y degasificada) es la que no muestra contaminantes: (Cromatograma 1c). Se comprueba que el agua nombrada HPLC es confiable para el objetivo de nuestro trabajo.

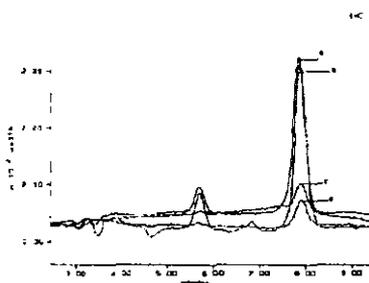


Figura 1c.- Cromatograma que muestra la confiabilidad del agua HPLC utilizada en la filtración. Se compara el agua de diferentes fuentes: a) un desionizador, b) un Moli-Q-desionizador, c) un desionizador de osmosis inversa, d) agua HPLC; las cuales presentan variación en concentración de NO_2 y NO_3 .

1.d. Curva tipo.

Al pasar la muestra de $\text{NO}_2/\text{NO}_3/\text{Br}$ en diferentes concentraciones, se obtiene el siguiente cromatograma (1e), el cual muestra en un orden, la elevación de los picos conforme aumenta la concentración de las soluciones. En éste cromatograma aparecen los iones de: cloruro (Cl^-), nitrito (NO_2^-), bromuro (Br^-), y nitrato (NO_3^-) respectivamente. En la curva tipo se observa una correlación lineal de cada uno de los iones; por lo que la medición a través del HPLC de NO_2/NO_3 en una muestra acuosa es proporcional a la concentración real de la muestra.

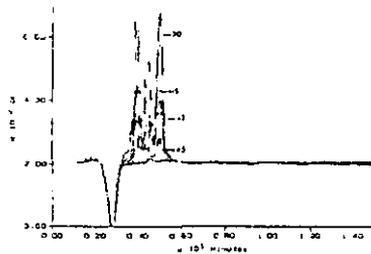


Figura 1d.-Cromatograma de los iones, nitrito, bromuro y nitrato. Se observa el orden de la elevación de los picos conforme aumenta la concentración de las soluciones. En éste cromatograma aparecen los iones de: cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, respectivamente.

2. - Resultados de la preparación de las muestras biológicas inyectadas en el HPLC.
2.a. Precipitación de proteínas por medios ácidos.

Para eliminar dichas proteínas de la muestra, se precipitó con diferentes ácidos: ácido acético, ácido perclórico (HClO_4), acetónitrilo, ácido clorhídrico (HCl). Con el ácido acético al 40%, las proteínas precipitan en baja proporción, y se necesita una concentración alta para que las proteínas sean eliminadas y con tal concentración de ácido la columna no soporta una mayor concentración y quedaría inutilizada. Se inyectó al HPLC ácido perclórico, la concentración del ácido que se preparó, es tal, para que no afecte la columna, y por lo tanto no es el suficiente para que precipiten las proteínas, además produce baja resolución e inestabilidad en la línea base, por consiguiente ésta posibilidad se descarta para eliminar partículas y principalmente proteínas por medio de la acidez. (ver figura 2a).

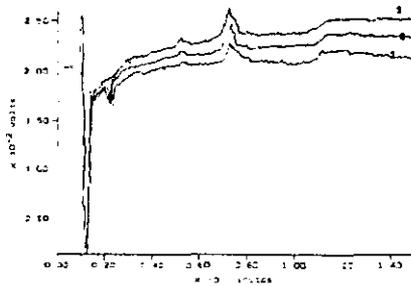


Figura 2a.-Cromatograma de la precipitación de proteínas por medio ácido. Para eliminar dichas proteínas de las muestras, se intentó precipitarlas con diferentes tipos de ácidos: 1.- ácido acético, 2.- ácido perclórico y 3.- ácido clorhídrico.

2.b. Proceso de purificación de NO_2/NO_3 de muestras biológicas, por tamices moleculares (Uf), por fase reversa (Sep-Pak).

Al comparar los cromatogramas: (Figuras: 2b1, 2b1.1, 2b1.2.), observamos que la prueba del agua HPLC (HPLC) se encuentra prácticamente sin picos y se ve la ausencia de NO_2/NO_3 que a diferencia del cromatograma del ultra free (Uf) encontramos que tres picos que podrían distorsionar en gran medida la concentración de NO_2/NO_3 en los resultados, pero en el cromatograma (Cnf) correspondiente a la del agua procesada, encontramos que esos picos disminuyen en gran medida, sin que lleguen a alterar los resultados de las muestras inyectadas en el HPLC.

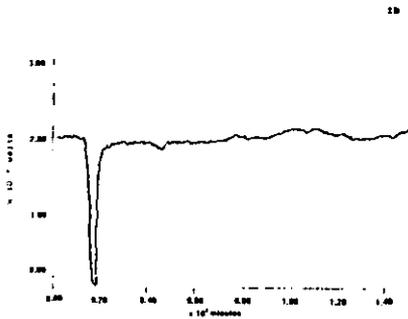
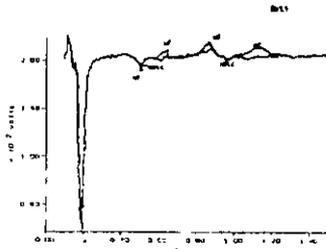


Figura 2b1.-Cromatograma de la determinación de contaminantes, en las membranas utilizadas en el proceso. Prueba del agua HPLC.



↑ 2.2

Figura 2b1.1.- Agua filtrada a través del Ultra free. Se compara el cromatograma del agua HPLC sin tamizar, con el cromatograma uf, el cual los picos disminuyen, sin que alteren los resultados de las muestras inyectadas en el HPLC.

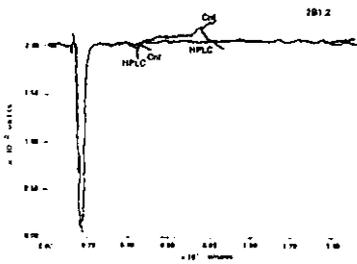


Figura 1b1.2.- Cromatogramas que se compara el agua HPLC (PLC) agua pasada por todos los filtros, observando una pequeña diferencia en los picos, los cuales disminuyen en el agua procesada (Cnt).

En la prueba para la eliminación de NO_2 o NO_3 en los Sep-pak cartuchos C18, se etiquetaron de la siguiente manera:

- SP20 lavado con 20 ml de agua desionizada.
- SP40 lavado con otros 20ml, en total 40ml de agua.
- SP60 lavado con otros 20ml, en total 60ml de agua.
- SP80 lavado con otros 20ml, en total 80ml de agua.
- SP100 lavado con otros 20ml, en total 100ml de agua.
- SP120 lavado con otros 20ml, en total 120ml de agua.

Para determinar la cantidad de agua necesaria en la eliminación de contaminantes, se obtuvieron los siguientes cromatogramas respectivos (ver Figuras: 2b2, 2b2.1, 2b2.2):

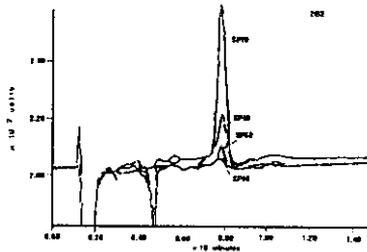
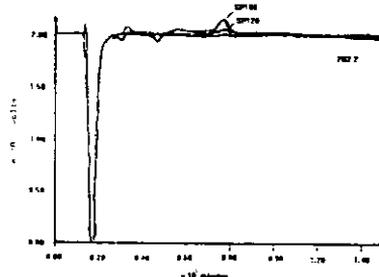
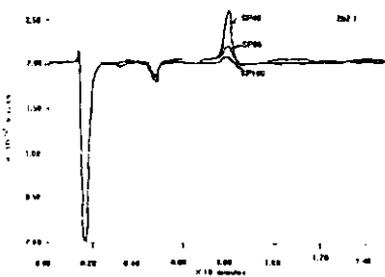


Figura 2b2.-Cromatograma de la detección de contaminantes en los cartuchos Sep-Pak lavados con 20 a 80 ml de agua HPLC.



Figuras 2b2.1, 2b2.2.- Cromatogramas de los lavados del Sep-Pak con 40 a 100 y con 100a 120ml de agua HPLC respectivamente.

Se observa que con 120 ml de agua, queda el cartucho libre de contaminantes y se decide lavar el Sep-pak cartuchos C18 con 120 ml de agua HPLC.

2.c. Detección de proteínas en el proceso de purificación por filtración.

Tomando como referencia la curva de determinación de proteínas, comparamos las muestras a cada paso de filtrado para observar cómo disminuye la concentración de proteínas y péptidos, conforme van pasando a través de los filtros. y esto indica que puede ser confiable la solución final y por lo tanto fue posible inyectarlas en el HPLC.

Se hizo una curva de concentración de proteínas en un medio de cultivo y plasma, para la purificación de muestras se utilizó el método de Bradford a diferentes concentraciones y se leyó en el espectrofotómetro vis obteniéndose los siguientes resultados:

AP B (La lectura se hace por duplicado). volumen 1 y 2, el resultado de la DO. (Ver figuras 2c.1, 2c.2.)

Tablas 2c.1 y 2c.2: Resultados de las muestras que llevaron un proceso de filtrado, para identificar la eliminación de las proteínas. En éstos resultados se observa que al ir pasando la muestra a los filtros correspondientes, si se van eliminando las proteínas, y péptidos posibles, hasta quedar eliminados. MC = Medio de cultivo, S = Suero, Fn = Filtro negro, Sp = Sep-Pak, Fr = Filtro rojo.

Conc. µg/ml	DO1	DO2	prom
0	0.008	0.2770	0
10	0.5440	0.6140	0.5790
20	0.7800	0.7400	0.7600
40	0.8730	0.8930	0.8830
80	0.9980	1.0160	1.0070
100	1.0420	1.0440	1.0430

MC+S	—	0.89	0.914
MC+S+Fn	0.3420	0.3680	0.355
MC+S+Fn+Sp	—	0.02	0.0200
MC+S+Fn+Sp+Fr	0.030	0.0210	0.022

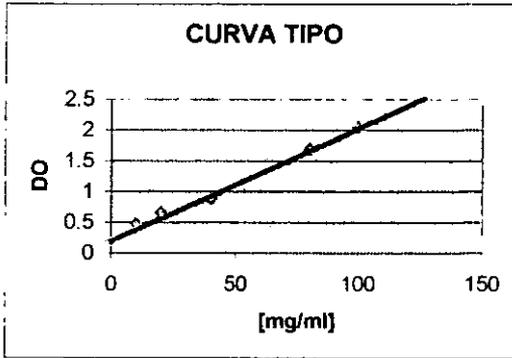


Figura 2c.1.- Gráfica de la curva tipo para la identificación de proteínas.

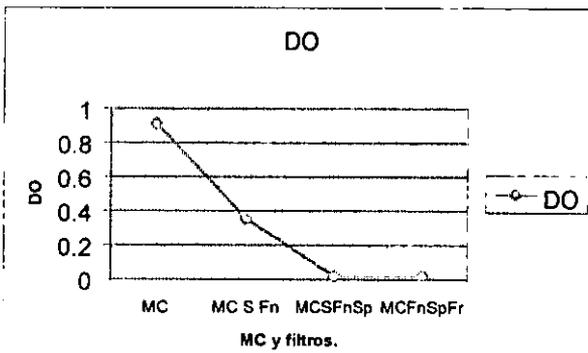


Figura 2c.2.-Gráfica de la identificación de partículas protéicas localizados en los filtros utilizados.

2.d. Interferencia del ion cloruro (Cl^-) con $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$.

Como se observó en el cromatograma (2d.0), el pico negativo del ion cloruro enmascara al ion nitrito, por lo que decidimos inyectar la mezcla a molaridades diferentes de fase móvil (cromatograma 2d) obteniendo diferentes cromatogramas en los que los picos inversos del ion cloruro (Cl^-) se van recorriendo, y gracias a éste desplazamiento de los picos, se va percibiendo el pico del ion nitrito NO_2^- , que se encontraba enmascarado por el pico del ion cloruro (Cl^-). Aunque no se observa una resolución clara entre el Cl^- y NO_2^- , encontramos que la molaridad óptima es 1.8 mM (cromatograma 2d.1) y decidimos para eliminar el enmascaramiento, diluir las muestras biológicas 1:10.

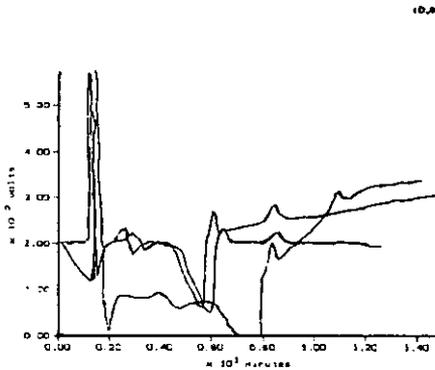


Figura 2d.0.-Interferencia del ion cloruro. Se observa un pico negativo del ion cloruro, el cual enmascara al ion nitrito y no es posible ver con veracidad al pico del ion en cuestión.

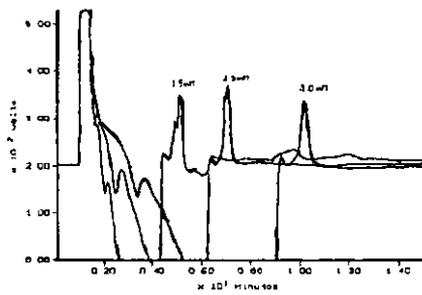


Figura 2d.-Fase móvil a diferente molaridad. Se hicieron soluciones de fase móvil a diferentes concentraciones para identificar en cuat no se presenta el enmascaramiento del ion cloruro. Se presentan dichas pruebas.

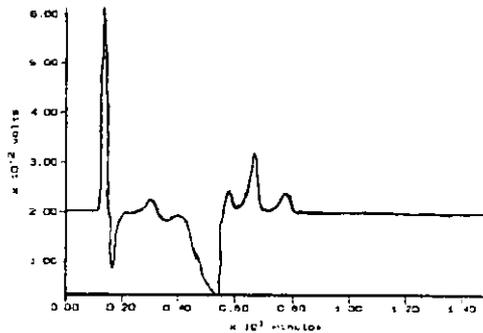


Figura 2d.1.-Fase móvil con la concentración de 1.8 nM diluida la muestra 1:10. Con ésta concentración de la fase móvil, se puede percibir los picos de los metabolitos problema con el hundimiento del ion cloruro sin enmascarar.

3. -Resultados de la extracción de NO_2/NO_3 en experimentos biológicos.

3a. Resultados de la mezcla de NO_2 , NO_3 y Br con medio de cultivo sin rojo de fenol.

En éste experimento se observa dicha curva como tal la cual aumenta el pico conforme la concentración, es mayor, es fácil de percibir todos los picos de cada concentración de la más diluida a la más concentrada.

Se trabajó con diferentes medios de cultivo, uno con rojo de fenol y otro sin rojo de fenol, comparando los resultados, (ver cromatograma 3aCRF: medio de cultivo con rojo de fenol; y 3aSRF: medio de cultivo sin rojo de fenol). Se observa que si interfiere el rojo de fenol en las sustancias a medir, comparado con el cromatograma, el cual, las disoluciones tienen rojo de fenol; hay una variación en los picos de la curva sin rojo de fenol, los picos indican cantidades constantes y definidas de los iones NO_2/NO_3 y en la curva tipo de la dilución del medio de cultivo con rojo de fenol, se encuentran mucho más picos, lo cual indica que a parte de la gran cantidad de NO_2/NO_3 , están presentes otros iones no identificados. Por lo tanto en medio de cultivo, no debe contener rojo de fenol para evitar interferencia espectrofotométrica en la determinación de los metabolitos.

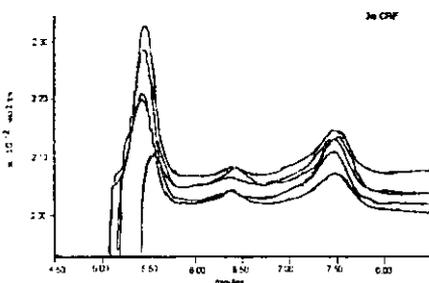


Figura 3a.CRF.-Medio de cultivo con rojo de fenol. Hay una gran variación en los picos de la curva, lo cual indica una cantidad muy pequeña de los iones nitrito y nitrato, y en la curva tipo de la dilución del medio de cultivo con rojo de fenol, se encuentran otros picos, indicando que están presentes otros iones no identificados.

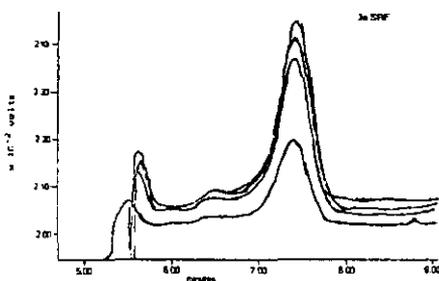


Figura 3a.SRF.-Medio de cultivo sin rojo de fenol. Se hace la comparación con el medio de cultivo con rojo de fenol, encontrando la diferencia en la cantidad de picos, el cual indica que el medio de cultivo sin rojo de fenol es el más indicado para nuestro objetivo

3.b. Experimento de extracción del medio de cultivo con glomérulos.

Con los experimentos realizados, en los cuales, se procesaron diferentes tipos de sustancias con las que se compara y comprueba la actividad de dichas sustancias: Medio de cultivo con glomérulos, inyectado en el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) y leído en el cromatograma. Considerando el valor de conversión que es de $1 \mu\text{volt} = 1 \mu\text{DO}$. Extrapolando contra la concentración, se obtuvieron los siguientes resultados de cada experimento.

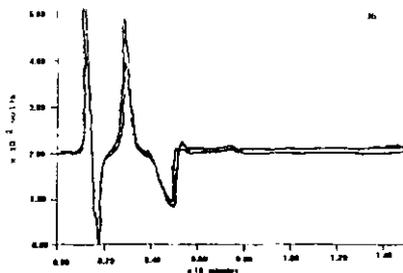


Figura 3b.-Experimento de extracción de la mezcla de NO₂/NO₃/Br⁻ en medio de cultivo.

3b.experimento 1.

Con los resultados obtenidos en las gráficas se percibe que el medio de cultivo aun sin los glomérulos, hay una cierta cantidad de NO_2/NO_3 , y cuando en la muestra se encuentran los glomérulos, se nota una elevación, la cual indica que los gromérulos son capaces de producir NO_2/NO_3 , y aún más, cuando éste medio de cultivo se le adiciona Arginina, hay una elevación en la producción de NO_2/NO_3 , elevándose aun más cuando el medio de cultivo está con glomérulos y actuando la arginina; y sin embargo, cuando éstos glomérulos se encuentran con LNMMA que es un inhibidor de la actividad de la Arginina, se observa una baja en la producción de los NO_2/NO_3 . No varía la producción al estar los glomérulos o no. Los lipopolisacáridos LPS con el medio de cultivo no se aprecia modificación, está igual que el medio de cultivo con los glomérulos, (siendo ésta, la prueba basal del experimento). Pero se puede observar una elevación de los LPS al agregarle los glomérulos (factor importante para la producción de los NO_2/NO_3). La acetil colina con el medio de cultivo se ve aumentada la producción cuando tiene los glomérulos y se observa que aumenta la concentración de con la molécula endotelina (Et) y los glomérulos. (ver gráficas 3b.1.y 3b1.1 y cromatograma 3b.1)

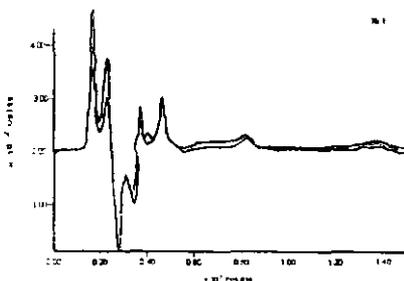


Figura 3b.1.-Experimento1 Medio de cultivo con y sin glomérulos, se le adicionan otras moléculas tales como arginina, LNMMA y LPS.

Tabla 3b.1.- Resultados del experimento 1. Medio de cultivo con glomérulos y diferentes moléculas.

Clave	NO ₂ nMol/ml	NO ₃ nMol/ml	NO ₂ /NO ₃ nMol/ml
MC	72	166	238
MC + G	78.33	206.66	284.99
MC + Arg	140.66	310	450
MC + Arg + G	143.66	311	454
MC + LMMA	114.66	195	309.66
MC + LMMA + G	116	197.33	313.33
MC + LPS	117	158	275
MC + LPS + G	146	428	394
MC + Ach	134	205	339
MC + Ach + G	134	293	427
MC + Et + G	152	170.3	322.3

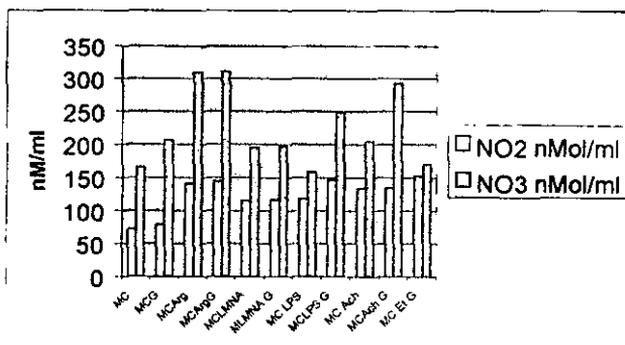


Figura 3b.1.-Gráfica de los resultados de la identificación de NO₂/NO₃, en medio de cultivo con y sin glomérulos, adicionándole otras sustancias.

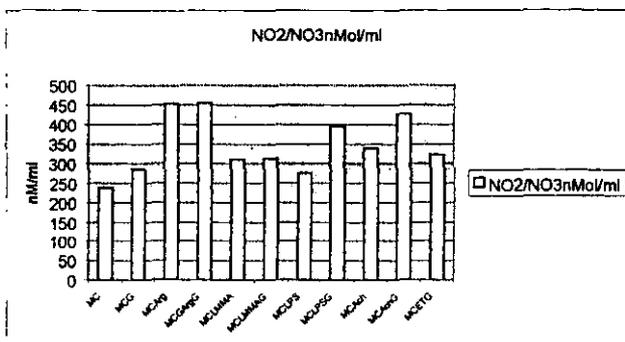


Figura 3b1.1.-Gráfica del experimento 1 con la suma de los resultados de NO₂/NO₃.

3b.Experimento. - 2.

Tabla 3b.2 Resultados del experimento 2. Muestras del medio de cultivo con otras variantes.

Clave	NO ₂ nMol/ml	NO ₃ nMol/ml	NO ₂ NO ₃
1. -MC	127	312	439
2. -MC + G	188	480	575
3. -MC + LMNNA	126	312	438
4.-MC + LMMNA + G	122	386	508
5. -MC + Et	158	381	539
6. -MC + Et + G	111	357	468
7. -MC + Et + LMMNA	106	294	400
8. -MC +Et + LMMNA + G	115	296	411

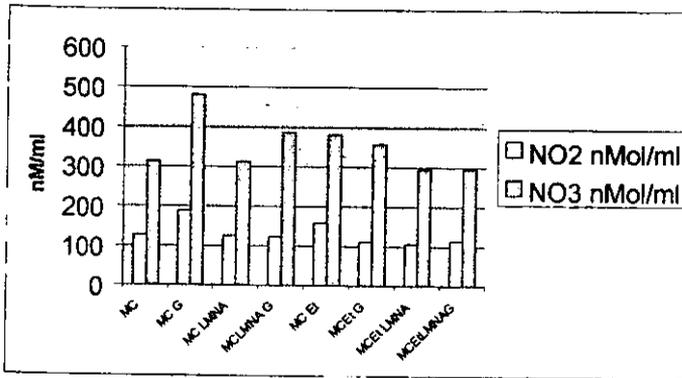


Figura 3b.2.-Gráfica de los resultados del experimento 2 indicando los valores de NO₂/NO₃ por separado.

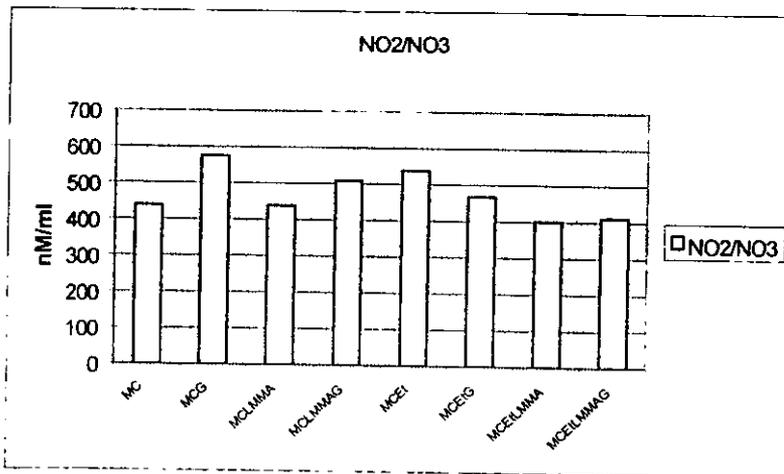


Figura 3b.2.1.-gráfica de los resultados del experimento 2 con la suma de los metabolitos.

La prueba del medio de cultivo solo y la del medio de cultivo con glomérulos, son los basales, los cuales se hace la comparación para las demás pruebas con las determinadas moléculas a comparar. La producción del inhibidor LNMMA es muy similar a la del medio de cultivo solo por lo que se podría decir que no hay considerable producción de NO_2/NO_3 , pero se nota una elevación en presencia de los glomérulos, no la misma que si se compara con la del medio de cultivo y glomérulos. La endotelina hace que aumente la producción de NO_2/NO_3 , la cual es inhibida su actividad por la acción de la LNMMA que aumenta muy poco con la presencia de los glomérulos. (ver las figuras de las gráficas y el cromatograma 3b.2).

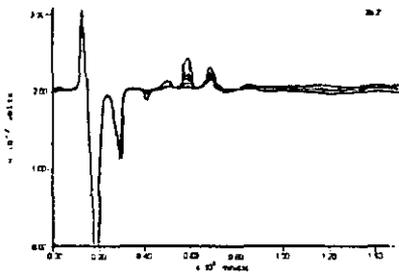


Figura 3b.2.- Cromatograma del experimento 2. En el medio de cultivo hay más nitritos que nitratos, al agregarle los glomérulos aumenta la concentración de nitritos y disminuyen los nitratos. La molécula LNMMA hace que haya una disminución en la producción de nitritos y nitratos a pesar de la presencia de glomérulos, sigue siendo una baja concentración.

3b.Experimento. - 3.

Como ya se sabe, la Arginina impulsa la producción de NO_2 . La LNMMA en ausencia de glomérulos, no tiene alteración en la disminución de la síntesis de NO_2/NO_3 . Los glomérulos con la molécula A23187 hay una alta concentración de NO_3/NO_2 , esto indica que se acelera el metabolismo del NO; que la actividad de ésta molécula puede ser inhibida por la LMMNA. Cuando se le agregan a los glomérulos las dos moléculas que producen NO (A23187 y Arginina), hay una interacción que impide la producción total de NO, la cual tampoco puede ser inhibida en gran parte por la LMMNA. (ver gráfica 3b.3 y cromatograma 3b.3).

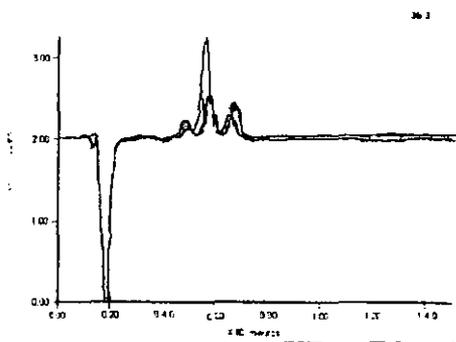


Figura 3b.3.-Cromatograma del experimento 3. Los glomérulos con la molécula A23187 aumenta la concentración de nitratos y muy poco de nitritos, esto indica que se acelera el metabolismo del óxido nítrico hasta nitrato; que la actividad de ésta molécula puede ser inhibida por la LMMNA.

Tabla 3b.3 Resultados del experimento 3. Medio de cultivo, tomando en cuenta otros compuestos, para su comparación.

A continuación el significado de las abreviaciones:Medio de cultivo (MC). Glomérulos (G). Arginina (Arg). L-Monometil-arginina (LMMA). LPS. Acetilcolina (Ach). Endotelina (Et).

Clave	NO ₂ nMol/ml	NO ₃ nMol/ml	NO ₂ /NO ₃ nMol/ml
MC	136	245	381
MC + G	214	242	456
MC + Arg + G	136	861	1097
MC + LMMA	125	485	610
MC + LMMA + G	263	642	905
MC + A23187 + G	430	1493	1923
MC + A23187 + LMMA + G	220	563	783
MC + A23187 + Arg + G	640	867	1507
MC + A23187 + Arg + LMMA + G	610	800	1410

Medio de cultivo, tomando en cuenta otros compuestos, para su comparación.

A continuación el significado de las abreviaciones.

Medio de cultivo (MC). Glomérulos (G). Arginina (Arg). L-Monometil-arginina (LMMA). LPS. Acetilcolina (Ach). Endotelina (Et).

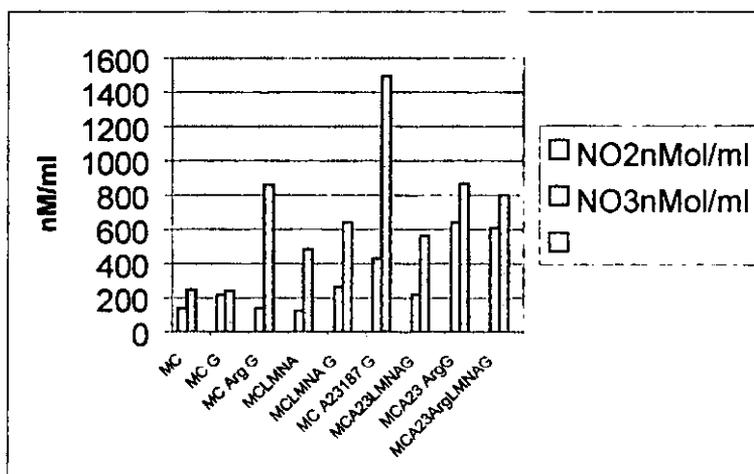


Figura 3b3.-Gráfica de los resultados del experimento 3, donde los metabolitos estan por separados.

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

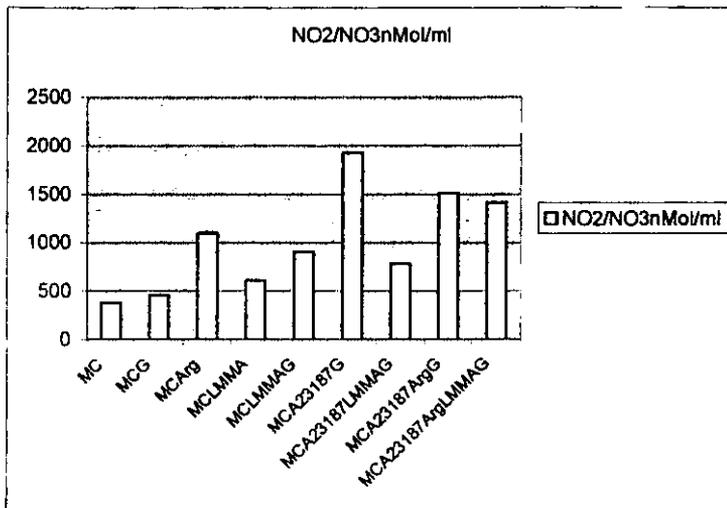


Figura 3b3.1.-Gráfica de los resultados del experimento 3 con la suma de los metabolitos.

3.c. Determinación de NO₂/NO₃ en orina de voluntarios sanos.

Resultados de la determinación de NO₂/NO₃ en orina de voluntarios sanos, después de la infusión de proteínas a diferentes tiempos. Los resultados se presentan en volt y concentración: μDO (ver figuras: 3c.1, 3c.2, 3c.3)

Tabla 3c. Resultados de la determinación de NO₂/NO₃ en orina.

Clave	NO ₂ μDO	NO ₃ μDO	NO ₂ nMol/ml	NO ₃ nMol/ml
AB-3	4030	98789	15.13	371
AB-8	81392	29177	180.16	646
AE-3	7633	97425	58	736
AE-8	262752	393480	496	742
EE-3	14762	50357	264	901
EE-8	93114	112483	1023	1236
FL-3	9886	49852	108	548
FL-8	183635	18248	1006	1338
GJ-3	25634	67770	107	282
GJ-8	38267	221025	119	687
GH-3	29196	8227	306	314
GH-8	379048	309388	675	551
IE-3	13791	35381	175	450
IE-8	13562	33374	267	613

Dentro del proceso de infusión de las proteínas, se aprecia una concentración considerable de NO₂/NO₃ siendo NO₃ la más alta. Y en la siguiente toma de muestra, se observa el aumento en la filtración renal de NO₂/NO₃ donde las concentraciones de NO₂/NO₃ son casi al mismo nivel de concentración, siendo aún más alta la de NO₃.

Nota: Las letras significan la identificación del paciente y los números 3 y 8 es el número durante el proceso de la infusión de las proteínas; en la muestra 3 es basal y la muestra 8 es donde se ha demostrado el aumento en la filtración renal después de la infusión de aminoácidos.

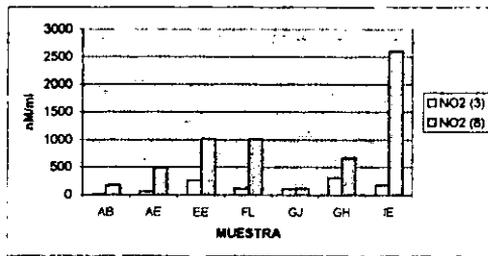


Figura 3c.1-Gráfica de la determinación del metabolito NO₂ en orina de voluntarios sanos.

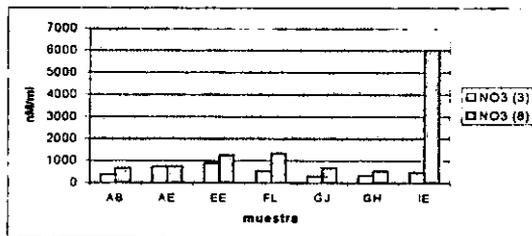


Figura 3c.2-Gráfica de la determinación del metabolito NO₃ en orina de voluntarios sanos.

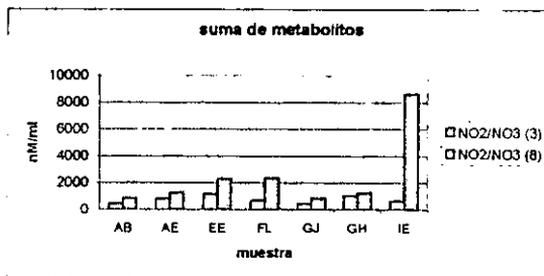


Figura 3c.3.- Gráfica de la determinación de los metabolitos del NO (NO₃/NO₂) en orina de voluntarios sanos leída en nMol/ml.

VIII.- DISCUSION.

La medición de NO en muestras biológicas, es importante. Los métodos establecidos previamente, son complejos e inexactos, debido a la inestabilidad del NO por lo que la medición de sus metabolitos secundarios, nos acerca a la realidad o a la determinación de la concentración real del NO.

En los métodos directos para la medición del NO, encontramos el de quimioluminiscencia el cual, su sensibilidad es muy alta, pero tiene un inconveniente de que; al acidificar las muestras, que contienen NO₂/NO₃, estas deben reducirse a NO y esto afecta a la exactitud de los resultados. Podemos mencionar otro gran problema, que para su calibración se requieren tanques con NO puro y hacer diluciones de esta, haciéndolo peligroso y difícil de calibrar. Otro método de medición directa es en el que se utiliza un microelectródo que tiene la más alta sensibilidad (10^{-2}), además con éste se puede medir directamente la producción de NO in situ, teniendo el principal problema, es el costo y la calibración del sistema, que tiene el mismo inconveniente, que el método de quimioluminiscencia, que es peligroso y difícil de calibrar.

En cuanto a los métodos indirectos, que miden principalmente NO₂ pero no NO₃, por lo que en todos estos métodos hay que reducirlos a NO₂ con el uso de métodos químicos (la reducción con cadmio cuprisado), métodos enzimáticos (nitrato reductasa con NADPH) que son caros.

Dada la dificultad para medir NO directamente, decidimos medir metabolitos secundarios (NO₂/NO₃) del NO y la dificultad de medir en un solo paso los NO₂/NO₃, nos dimos a la tarea de buscar un método que nos permitiera medir a los NO₂/NO₃ de forma simultanea y encontramos en la literatura que la comisión de agua de USA, tiene entre sus protocolos en el análisis de pureza de agua, la medición de NO₂ utilizando HPLC y de forma reciente, comercialmente apareció en el mercado una columna (para el HPLC), que nos permitió separar en una sola corrida NO₂ de NO₃, y a 214 nm, dar una lectura en la cual solo absorbe éstos analitos y esto nos permite calcular la concentración de estos. Aunque el punto más crítico (como en cualquier metodología en el HPLC), es el proceso mediante el cual, nosotros extraemos el analito que queremos medir de la muestra biológica, entonces el punto más importante de nuestro trabajo, fue estandarizar esta metodología bajo las condiciones del laboratorio, entre ellas la calidad del agua que utilizamos, los métodos tradicionales para desproteinizar (precipitación con ácidos) y la calidad de los filtros, tamices moleculares y Sep-Pak. Todos éstos, como se observó contenían en cierta proporción NO₂/NO₃ que afectaban la exactitud de nuestra medición, por lo tanto, parte de nuestro trabajo fue estandarizar el método para eliminar estos contaminantes. Pero ya estandarizado el método, demostramos que con muestras biológicas, es posible determinar los metabolitos secundarios, tales como

medio de cultivo y orina. Revisando literatura más reciente, se encontró una referencia de 1997 donde hablan de la comparación de los métodos ya establecidos sin ninguna nueva metodología para medir NO o metabolitos secundarios (NO_2 , NO_3). El otro artículo habla de la posibilidad de medir NO de una manera también indirecta, la cual es utilizando el HPLC para determinar la presencia de moléculas relacionadas con la actividad del NO como son: L-Hidroxiarginina, L-arginina, L-monometilarginina, L-dimetilarginina, en muestras de suero humano, desafortunadamente algunas de estas son inestables

IX CONCLUSION.

El objetivo de estandarizar un método para la determinación de NO por HPLC se cumplió, ya que se identificaron metabolitos secundarios del NO. Esto conlleva a realizar un nuevo protocolo para la purificación de las muestras biológicas de nuestro interés que se van a inyectar al HPLC. Por lo tanto, estas muestras deben quedar desproteinizadas, es decir, libres de proteínas, péptidos, partículas, contraiones o cualquier otro contaminante. Los motivos son, que el NO es muy inestable y por eso se tendría que reducir; en nuestro trabajo no hay necesidad de esto, pero para que sea inyectada la muestra a la columna del HPLC, debe estar libre de todo contaminante y no haber sido acidificada; éste propósito se logró, gracias a los filtros utilizados, los cuales se le probó su calidad y pureza o se hizo que cumplieran con los requisitos necesarios.

Posteriormente se demuestra la veracidad del método evaluando, la producción del NO en los glomérulos cultivados, de los cuales se mide en medio de cultivo con diferentes moléculas que modifican la producción del NO, obteniendo los resultados esperados. También comparamos el incremento del NO al infundirles una solución con aminoácidos a voluntarios sanos, midiendo la orina y observamos que después de infundir una solución con aminoácidos, aumenta la filtración renal debido al incremento de NO que se refleja en una mayor generación de NO en la octava muestra después de la infusión de aminoácidos. De forma general, podemos decir que éste método es uno de los mejores para medir metabolitos secundarios del NO en muestras biológicas.

Este método es sencillo, no hay necesidad de utilizar demasiadas soluciones, ni tantos pasos o aparatos; es seguro, no hay riesgos por alguna solución, un tipo de gas o aparato, es muy sensible, exacto, preciso y selectivo. El HPLC con su determinada columna, nos da los valores esperados y confiables. Por lo tanto podemos medir metabolitos estables (NO_2 , NO_3) simultáneamente sin tener que reducirlos.

XII.-REFERENCIA:

1. - Aisaka, K., Cross, S. S., Griffith, O. W., and Levi, R.: NG- methylarginine, an inhibitor of endothelium- derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 881-886, 1989.
- 2.- Archer, S.L, and Cowan, N. J.: Acetylcholine causes endothelium dependent vasodilatation but does not stimulate nitric oxide production by rat pulmonary arteries or elevate endothelial cytosolic calcium concentrations. *Circ. Res.* 68, 1569-1581, 1991.*
- 3.- Archer, S.: Measurement of nitric oxide in biological models. *J. 7: 349-360, 1993.*
- 4.- Arroyo, C., and Kohno. M.: Difficulties encountered in the detection of nitric oxide (NO) by spin trapping techniques A cautionary note. *Free Radic. Res. Commun.* 14. 145-155, 1991.
- 5.- Block, R.J., Lestrage, R., y Zweig, G.: *Paper Chromatography-a Laboratory Manual.* Academic Press Inc., New York, 1952.
- 6.- Buse, R., and Mulsch, A.: Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodium. *FEBS Lett.* 265: 133-336. 990.
- 7.- Chu, A., Lin, C.- C., Chambers, D. E. Kuehl, W. D., Palmer, R. M., Moncada, S., and Cobb, F. R.: Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal tone and endothelium-dependent responses of the coronary arteries in awake dogs. *J. Clin. Invest.* 87: 1964-1968, 1991.
- 8.- Craven, P.A., and DeRubertis, F.R.: Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and heme proteins: evidence for the involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J. Biol Chem.* 253, 8433-8443, 1978.
- 9.- Furchgott, R.F., Khan, M. T., and Jothianandan, D.: Comparison of properties of nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: some cautionary findings. In *Endothelium-derived Relaxing factor*, ed. by G. M. Rubanyi and P. M. Vanhoutte, pp. 82. Karger, Basel, Switzerland. 1990.
- 10.- Furchgott, R., and Zawadzky, J.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)* 288. 373-376, 1980.
- 11.- Gilbert H. Aires, *Análisis Químico Cuantitativo.* Harla Harper and Row. Latinoamericana 2ª Edt. Méx. 1970. pp. 180-183.

- 12.- Granger DL, Hibbs JB Jr, Brkoadnax LM. Urinary nitrite excretion in relation to murine macrophage activation. *F Immunol* 1991; 146: 1294-302.
- 13.- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L. Wishnok, J.S. and Tannanbaun, S.R.: Analysis of nitrate, nitrite and (15N)nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126: 131-138, 1982.
- 14.- Guayao, W.U. and Brosnan, J.T.: Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochem J*. 281:45-48,1992.
- 15.- Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR.: L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *F Immunol* 1987; 138: 550-65.
- 16.- Ignarro, L. J.: Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation* 65:1-21, 1989.
- 17.- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Medical Sciences*. 84:9265-9269,1987.
- 18.- Komori, K., and Susuki.: Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilatation in the rabbit saphenous artery. *Circ. Res.* 61: 586-593, 1987.
- 19.- Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RMJ, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *F Immunol* 1990: 144: 4794-97.
- 20.- Long, C.J., Shikano, K., and Berkowitz, B. A.: Anion exchange resins discriminate between nitric oxide and EDRF. *Eur. J. Pharmacol.*, 142: 317-318, 1987.
- 21.- Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, R., and Bohme, E.: Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor : a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} - dependently converts L- arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 678-685, 1989.
- 22.- Meyer J, Richte N, Hecker M.: High-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide synthase-related arginine derivatives in vitro and in vivo. *Anal Biochem* 1997 Apr 5;247 (1):14.
- 23.-Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A.: Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Amer S. Pharmacol and Exptl Ther.* 43.2:109-142,1991.
- 24.- Murray, J. L., Fridovich, I., Makhoul, R. G., and Hagen, P. O.: Satabilization and partial Characterization of andothelium derived relaxing factor from cutured bovine aortic endothelial cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 141: 689-696, 1986.
- 25.- Palmer, R. M. J., Ashton, D. S., and Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature (Lond)* 333: 664-666, 1988.

- 26.- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond.)* 327: 524-526. 1987.
- 27.- Privat C, Lantione F, Millanvoeye van Brussel E, Devynck J, Devynck MA.:Nitric Oxide production by endothelial cell: comparison of three methods of quantification.*Life Sci* 1997; 61(12):1193-202.
- 28.-Rees, D.D., Palmer, R.M. J., Hodson, H. F. and Moncada, S.: A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.* 96: 418-424, 1989.
- 29.- Rees, D.D., Palmer, R. M. J., and Moncada, S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86. 3375-3378, 1989.
- 30.- Schmidt, H. H. H. W., Nau, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K. E., Klein, M. M., Niroomand, F. and Bohme, E.: Arginine is a Physiological precursor of endothelium- derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 154: 213-216. 1988.
- 31.- Snyder, S.H. and Bredt, D.S.: Biological roles of nitric oxide. *Sci Amer*, 28-35,1992.
- 32.- Vallance, P., Leone, A., Collier, J. and Moncada, S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 339:572-575,1992.
- 33.- Thomas. G., and Ramwell. P.: Interaction of non-arginine compounds with the endothelium-derived relaxing factor inhibitor, NG-monomethyl L-arginine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 676-679, 1991.
- 34.- Tracey, W.R., Linden, J., Peach M.J. and Johns, R.A.: Comparison of spectrophotometric and biological assays for nitric oxide (NO) and endothelium-derived relaxing factor (EDRF), nonspecificity of the diazotization reaction for NO and failure to detect EDRF. *J. Pharmacol Exptl Ther.* 252.3:922-928,1989.
- 35.- Vallance, P., Leone, A., Collier, J. and Moncada, S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 339:572-575,1992.35.