

300627

6
207



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA UNAM

**METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION
DE POLIAMINAS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

LUZ MARIA DEL CARMEN GARCIA FERNANDEZ

MEXICO, D. F.

1986



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 está 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

I.	INTRODUCCION.	1
1.1	Biosíntesis	2
1.2	Degradación	4
1.3	Efectos biológicos de las poliaminas	5
1.4	Poliaminas en tejidos en crecimiento activo	5
1.5	Poliaminas en crecimiento neoplásico	7
1.6	Poliaminas y cáncer	9
1.7	Importancia de la determinación de poliaminas	10
	A) En tejidos y fluidos fisiológicos	10
	B) En microorganismos	10
	C) En plantas	11
	D) En alimentos	11
II.	MÉTODOS GENERALES PARA DETERMINAR POLIAMINAS	13
2.1	Generalidades	13
2.1.1	Primera Etapa	13
2.1.2	Segunda Etapa	14
2.1.3	Tercera Etapa. Métodos Modernos	15
III.	EXTRACCION Y PURIFICACION DE POLIAMINAS	19
3.1	Métodos de Extracción	19
3.1.1	Extracción con ácido perclórico	19
3.1.1.1	Extracción de tejidos	21
3.1.1.2	Extracción de suero	21
3.1.1.3	Extracción de plantas	21
3.1.2	Extracción con butanol	22
3.1.2.1	Extracción de tejidos animales	23
3.1.3	Extracción con alcohol isoamílico	24
3.2	Métodos de hidrólisis	24

3.2.1	Hidrólisis de orina con ácido clorhídrico	24
3.2.2	Hidrólisis de fluido amniótico con ácido clorhídrico	25
3.3	Métodos de desproteínización	25
3.3.1	Desproteínización con ácido tricloroacético	25
3.3.1.1	Desproteínización de semen	26
3.3.1.2	Desproteínización de un cultivo de <u>E.coli</u>	27
3.3.2	Desproteínización con ácido sulfosalicílico	27
3.3.2.1	Desproteínización de orina	28
3.3.2.2	Desproteínización de sangre	28
3.3.2.3	Desproteínización de suero o plasma	29
3.4	Métodos de anticoagulación	29
3.5	Métodos de purificación	30
3.5.1	Purificación por intercambio iónico	30
IV.	MÉTODOS CROMATOGRAFICOS	33
4.1	Clasificación	33
4.1.1	Cromatografía Líquido-Sólido	34
4.1.1.1	Formación de derivados para cromatografía líquida	35
4.1.1.2	Cromatografía de intercambio iónico	37
4.1.1.3	Cromatografía de capa fina	41
4.1.1.4	Cromatografía líquida de alta presión	48
4.1.2	Cromatografía de Gas	54
4.1.2.1	Formación de derivados para cromatografía de gas	55
4.1.2.2	Estándares internos	57
4.1.2.3	Condiciones generales para cromatografía de gas	59
V.	MÉTODOS ENZIMATICOS	63
5.1.	Generalidades	63
5.2	Oxidación enzimática de poliaminas	64

5.3	Cuantificación por oxidación con una enzima de frijol de soya	67
5.3.1	Preparación de la enzima de soya	68
5.3.2	Determinación de diaminas y poliaminas en muestras de orina	69
5.4	Métodos enzimáticos que emplean reacciones conjugadas	73
VI.	MÉTODOS INMUNOLÓGICOS	75
6.1	Acarreadores moleculares	75
6.2	Formación de anticuerpos	77
6.3	Purificación de anticuerpos	80
6.4	Determinación de la especificidad del antisuero	81
6.5	Procedimientos inmunológicos que emplean esferas de látex	83
6.5.1	Por visualización directa	83
6.5.2	Métodos nefelométricos	88
6.6	Radioinmunoanálisis	89
VII.	MÉTODOS PARA DETERMINAR POLIAMINAS EN DIVERSOS MATERIALES BIOLÓGICOS.	93
7.1	Orina	93
7.1.1	Cromatografía en capa fina de derivados de danilo	93
7.1.2	Cromatografía líquida de alta presión	97
7.2	Suero	101
7.2.1	Cromatografía de gas-Espectrometría de masas	101
7.3	Tejidos	107
7.3.1	Cromatografía líquida de alta presión de derivados debsilados	107
7.4	Otros materiales biológicos	110
VIII.	CONCLUSIONES	112

APENDICE	114	
I	Tabla de niveles normales de poli aminas en fluidos fisiológicos	114
II	Tabla de niveles de poliaminas en algunas enfermedades malignas y no malignas	115
III	Tabla de niveles de diaminas en algunos productos marinos	116
BIBLIOGRAFIA	117	
RESUMEN	129	

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
atm	Atmósferas
°C	Grados centígrados
CA	Cromatografía de adsorción
CAD	Cadaverina
CCF	Cromatografía de capa fina
CG	Cromatografía de gas
C _i	Curies = 3.7×10^{10} desintegraciones/segundo
CIC	Cromatografía de intercambio catiónico
CII	Cromatografía de intercambio iónico
CL-AP	Cromatografía líquida de alta presión
CM	Carboximetilo
col.	colaboradores
DAP	Diaminopropano
Dil.	Dilución
DNS	Dansilo
dpm	Desintegraciones por minuto
EAC	Acido ϵ -amino caproico
EM	Espectrometría de masas
EOC	Etil-oxi-carbonilo
ESD	Espermidina
ESM	Espermina
g	gravedad
h	horas
IgG	Inmuno γ globulina

Liq	Líquido
m	minutos
μ	micras
mg	miligramos
ml	mililitros
mM	milimolar
mm	milímetros
N	normal
n	nano
N-BOC	N-butil-oxi-carbonilo
ng	nanogramos
nm	nanometros
NPM	N-permetilados
n.r.	no reportado
OFA	o-ftalaldehído
P	peso
p	pico
PFp	pentafluoropropionilo
pg	picogramos
PLG	ácido poli-L-glutámico
PLL	poli-L-lisina
PM	peso molecular
pp	precipitado
PUT	putrescina
RIE	radioinmunoensayo
rpm	revoluciones por minuto

SAB	seroalbúmina bovina
semilog	semilogaritmo
SIM	selección iónica monitorizada
Sol	sólido
SP ⁻	sulfopropilo
TCA	ácido tricloroacético
TFA	trifluoroacético
T _g	tiroglobulinas
TMS	Trimetilsilicio
t RNA	RNA de transición
U	Unidades
UV	Ultravioleta
v	volúmen

CAPITULO I. INTRODUCCION.

Las poliaminas son bases nitrogenadas alifáticas no proteicas de bajo peso molecular.

El grupo mas estudiado está constituido por la diamina putrescina (PUT) y las poliaminas espermina (ESM) y espermidina (ESD).

La diamina cadaverina (CAD), ha sido poco estudiada pero sus características son muy similares a las del grupo de poliaminas anteriormente mencionado (1).

La estructura de las poliaminas se presenta en la siguiente tabla:

TABLA 1.1
ESTRUCTURA DE LAS POLIAMINAS

CLASIFICACION	NOMBRE	ESTRUCTURA
Poliaminas	ESPERMIDINA	$H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$
	ESPERMINA	$H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$
Diaminas	PUTRESCINA	$H_2N-(CH_2)_4-NH_2$
	CADAVERINA	$H_2N-(CH_2)_5-NH_2$

Las poliaminas se encuentran como constituyentes normales de una gran variedad de sistemas vivientes como: bacterias, hongos, algas, bacteriófagos, plantas y animales.

La mayor concentración de espermidina y espermina, se ha encontrado en algunos microorganismos y en tejidos de mamíferos como páncreas, próstata, tejido hepático en regeneración y glándula mamaria lactante, en los que se ha asociado con la síntesis de RNA, DNA y síntesis de proteínas (2). Estos datos parecen indicar que las poliaminas están involucradas en cierta forma con los procesos de crecimiento y diferenciación celular (3).

1.1 BIOSINTESIS.

La síntesis de poliaminas en tejidos animales, se deriva del ciclo de la urea vía L-ornitina que se convierte a putrescina por descarboxilación. La L-metionina se activa a S-adenosil L-metionina por ATP para ser utilizada posteriormente como donador de un grupo propilamino en la síntesis de poliaminas superiores.

Las tres enzimas que participan en la biosíntesis de putrescina, espermidina y espermina son: ornitina descarboxilasa y las aminopropil transferasas, espermidina sintetasa y espermina sintetasa.

La ornitina descarboxilasa, por ser una enzima alostérica de vida extremadamente corta, se considera reguladora de la síntesis de poliaminas.

Por otro lado, la conversión de putrescina a espermidina y de ésta a espermina, requiere como cofactor la forma descarboxilada de la S-adenosilmetionina, la S-adenosilhomocisteamina; por lo tanto, otra enzima, la S-adenosilmetionina-descarboxilasa es importante para la síntesis de poliaminas (Fig. 1.1) (1).

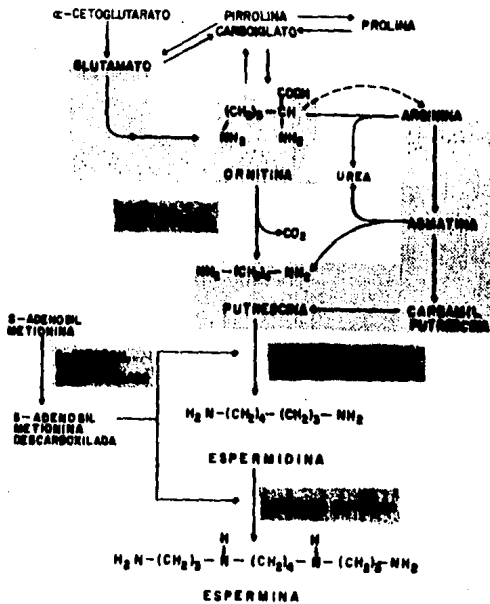
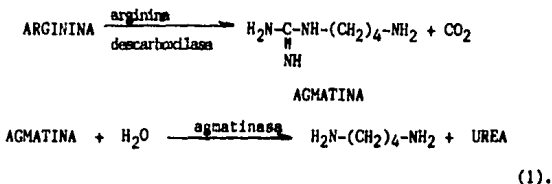


FIG. 1.1 BIOSINTESIS DE POLIAMINAS (1).

En plantas y microorganismos, se presentan las rutas de glutamato a ornitina, así como de arginina a putrescina.

En esta última ruta, la enzima arginina descarboxilasa cataliza la formación de putrescina :



1.2 DEGRADACION.

La putrescina sirve como sustrato a la enzima diamino oxidasa. Aunque la cadaverina, la espermidina y la espermina también pueden ser degradadas por la diamino oxidasa, es menos eficiente su acción sobre éstas.

En el catabolismo de poliaminas, pueden participar también otras enzimas que permiten transformar parte de estas moléculas en otras de utilidad para la economía celular.

La espermidina y la espermina pueden ser degradadas por la diamino oxidasa para dar putrescina, sustrato que por la acción de la aciltransferasa y de las amino oxidasas, puede transformarse en ácido succínico y éste a su vez, entrar al aciclo de Krebs para dar finalmente energía en forma de ATP (1).

TABLA 1.2

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS

-
1. POLIAMINAS COMO FACTORES DE CRECIMIENTO.
En micro-organismos.
En células de mamífero.
 2. ESTABILIZACIÓN DE MEMBRANAS CELULARES.
 3. ESTABILIZACIÓN DE PARTICULAS SUBCELULARES.
 4. ASOCIACIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS.
Estabilización del DNA contra la desnaturalización.
Asociación con t RNA.
Estabilización de la forma superenrollada del DNA.
Empacamiento del DNA en bacteriófagos.
Estimulación de la síntesis de DNA.
Estimulación de la síntesis de RNA.
Modificación de la actividad de ribonucleasas.
Estabilización del RNA recién sintetizado.
 5. EFECTOS SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.
Fijación de moléculas de t RNA a ribosomas.
Estimulación de metilación de t RNA.
Reemplazamiento de Mg^{++} en la reacción de aminoacil t RNA sintetasa.
Asociación con ribosomas.
Biogénesis de partículas ribosomales.
Fidelidad de la traducción.
Iniciación de la traducción.
Estimulación de la nucleotidiltransferasa de t RNA.
 6. EFECTOS SOBRE VARIAS REACCIONES METABÓLICAS.
Estimulación de nucleótido cinasas.
Modificación de las actividades de proteínas cinasas.
Incrementan la ADP-ribosilación de proteínas nucleares.
Activación de fosforilasa b.
Estimulación de lipólisis.
Activación de colina cinasa.
Incremento en la utilización de fructosa en espermatozoides (epidídimo).
Inhibición de ATP asa.
Modificación de la actividad de acetil colina esterasa.
Inhibición de la agregación de plaquetas.
Estimulación del metabolismo de estradiol en microsomas de hígado.
-

1.3 EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS.

La mayoría de los efectos biológicos ejercidos por las poliaminas en diversos sistemas, se deben principalmente a su naturaleza básica, ya que presentan una gran afinidad por compuestos y estructuras celulares con grupos cargados negativamente (4).

Se sabe que las poliaminas están ligadas a ácidos nucleicos y fosfolípidos y que pueden actuar como componentes funcionales o estructurales de los organelos de células eucariotes (5).

La idea de que las poliaminas no actúan intracelularmente como cationes inespecíficos, se apoya en la gran variedad de efectos que ejercen y que difícilmente podrían atribuirse solamente a su estructura química (4).

La tabla 1.2 resume los principales efectos biológicos de las poliaminas.

1.4 POLIAMINAS EN TEJIDOS EN CRECIMIENTO ACTIVO.

Los primeros estudios sobre la relación de las poliaminas con la proliferación celular fueron efectuados por Raina (7), en embriones de pollo en desarrollo, encontrándose una correlación entre la concentración de poliaminas y las concentraciones de proteínas y RNA.

Estudios posteriores concluyeron que los tejidos jóvenes y los tejidos relacionados con la síntesis activa de proteínas, contienen altas concentraciones

de espermidina que disminuyen rápidamente al aumentar la edad, mientras que el contenido de espermina, por lo general va aumentando (6).

Estos cambios, se expresan como una caída en la relación molar espermidina/espermina, en la mayoría de los tejidos al aumentar la edad.

Con base en estos estudios, una relación alta de espermidina/espermina debe tomarse como un indicador de crecimiento rápido en diversas circunstancias tales como:

- Regeneración de tejidos, como respuesta a una pérdida parcial por cirugía o daño por sustancias químicas.

- Hipertrofia cardiaca o renal (aumento de la demanda funcional).

- Estimulación por andrógenos, estrógenos, gonadotropinas y otras hormonas.

- Crecimiento neoplásico (6).

1.5 POLIAMINAS EN CRECIMIENTO NEOPLASICO.

El crecimiento neoplásico, es la formación de tejido nuevo de carácter tumoral, benigno o maligno.

Algunos estudios sobre el metabolismo de las poliaminas en células neoplá

sicas, demuestran una elevada producción de putrescina a partir de L-ornitina y una rápida conversión a espermidina.

La relación de espermidina a espermina promedio es de 1, lo que difiere mucho de las relaciones mucho mas elevadas encontradas en tejidos en crecimiento como el tejido hepático en regeneración. Esto es ampliado por estudios posteriores que concluyen que durante el envejecimiento de las células tumorales, existen cambios muy marcados en las concentraciones de poliaminas, que incluyen una disminución gradual en la relación espermidina/ espermina inicialmente alta.

El contenido notablemente alto de putrescina en las etapas iniciales, disminuye rápidamente después de la primera semana de inoculación de células tumorales "in vitro" (6).

Mientras que la espermidina y la espermina se reconocen como indicadores de tejido en crecimiento, la putrescina y la cadaverina pueden representar acción degradante ya que ambas son producto de la descarboxilación de ornitina y lisina respectivamente (algunos estudios reportan una excreción elevada de PUT y CAD en pacientes con enfisema pleural) (8).

La relación de las formas acetiladas N^1 y N^8 de espermidina en orina, también es indicadora de crecimiento neoplásico.

Mientras que en personas sanas la relación $N^1/N^8=1$, en pacientes cancerosos siempre es mayor que 2 (9).

1.6 POLIAMINAS Y CANCER.

Como se describió previamente, los tejidos embrionarios y otros tejidos en crecimiento acelerado, ya sean normales o neoplásicos, contienen altas concentraciones de poliaminas.

Hanäläinen, encontró elevadas concentraciones en el hígado y médula ósea de pacientes con leucemia (6).

A partir de ésto, se sugirió la posibilidad de utilizar la cuantificación de poliaminas como un indicador bioquímico y clínico de enfermedades malignas.

Russell y col. (10), observaron niveles elevados de poliaminas en la orina de pacientes con cáncer.

Investigaciones posteriores demostraron que las fluctuaciones en los niveles de poliaminas séricas y urinarias, se relacionan con el estado clínico de los pacientes (11).

Así, se han observado, niveles altos de poliaminas en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con tumores en el sistema nervioso central (12), en aspirados de médula ósea de pacientes con leucemia o linfoma (3) y en suero y orina de pacientes con otras formas de cáncer (12).

Altas concentraciones de poliaminas, a menudo se asocian con tumores localizados o en metástasis, mientras que bajas concentraciones se asocian a una remisión de la neoplasia (6).

1.7 IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE POLIAMINAS.

A) EN TEJIDOS Y FLUIDOS FISIOLÓGICOS.

La presencia de altas concentraciones de poliaminas en tejidos neoplásicos inmediatamente sugiere que pueden encontrarse en cantidades anormales en fluidos extracelulares, pero la determinación de poliaminas en éstos y en orina, tiene poco valor en el diagnóstico temprano del cáncer debido a que la contribución del tejido neoplásico al contenido total de poliaminas en el inicio, es demasiado pequeña para poder detectar el mal (6).

No obstante, la determinación de poliaminas en fluidos y tejidos fisiológicos puede proporcionar una valiosa prueba como complemento en el diagnóstico, y además, una ayuda en el control de la terapia (12).

B) EN MICROORGANISMOS.

El descubrimiento de los efectos biológicos de las poliaminas sobre el metabolismo celular ha sido producto del estudio de éstas en microorganismos. Los efectos más estudiados son: la estabilización de ácidos nucleicos (14) y su participación en la síntesis proteica (15).

La presencia de poliaminas en virus solo ha sido detectada en bacteriófagos que contienen DNA, estando siempre ausente en bacteriófagos que tienen RNA y que se replican en células eucariotes, por lo tanto la determinación de poliaminas en virus puede ser útil en su diferenciación.

La determinación de poliaminas, también ha sido empleada para diferenciar

organismos eucariotes de organismos procariotes, ya que estos últimos, son incapaces de sintetizar espermina (16).

C) EN PLANTAS.

En plantas, las poliaminas también están relacionadas con la regulación del crecimiento y del desarrollo. Por ejemplo, poliaminas adicionadas exó genamente promueven la formación de callosidades en algunos tubérculos, previenen el envejecimiento de las hojas y promueven la síntesis macromolecular y la mitosis en protoplastos de hojas de avena (17).

Debido a ésto, resulta útil determinar los niveles originales de poliaminas y los niveles óptimos para un crecimiento adecuado.

Así mismo, los efectos de algunos agentes promotores de crecimiento como la luz roja, deben a menudo, ser apoyados por la síntesis de poliaminas posterior a su aplicación.

D) EN ALIMENTOS.

Las poliaminas han sido objeto de estudio también en el campo de los alimentos, ya que algunas de estas aminas pueden ser nitrosadas o actuar como precursores potenciales de otras aminas capaces de formar nitrosaminas altamente carcinogénicas.

La espermidina y la espermina contienen grupos amino secundarios que pueden reaccionar con nitrito y la nitrosación podría ocurrir al ingerirse alimentos con estos componentes.

Lijinski y Epstein, postularon que la putrescina y la cadaverina pueden convertirse por calentamiento o cocimiento en pirrolidina o piperidina precursoras de aminas carcinogénicas. Otros estudios demostraron que la putrescina y espermidina al calentarse en presencia de nitrito forman N-nitrosopirrolidina. El nitrito está ampliamente distribuido en la naturaleza, por lo que existen posibilidades de que se formen precursores carcinogénicos a partir de poliaminas (18).

Otros autores han propuesto que las descarboxilasas de los microorganismos presentes en los alimentos en descomposición, pueden, en condiciones apropiadas, convertir aminoácidos a sus correspondientes aminas.

Las diaminas cadaverina y putrescina, que se forman a partir de los aminoácidos lisina y ornitina son producto de la descomposición bacteriana de tejidos animales. Por lo tanto, estas aminas, pueden usarse como indicadores de descomposición, si se comparan los niveles encontrados en productos descompuestos con los niveles en productos de calidad aceptable (19). *

* Apéndice

CAPITULO II. MÉTODOS GENERALES PARA DETERMINAR POLIAMINAS.

2.1 GENERALIDADES.

La sofisticación de los métodos para determinar poliaminas, ha ido aumentando paralelamente a la investigación en este campo.

Inicialmente, las poliaminas, fueron vistas solo como indicadores de la función reproductora masculina, posteriormente como promotores y/o reguladores del crecimiento y recientemente se ha propuesto que pueden ser indicadores del estado de salud o enfermedad humanas (20).

De este modo , los métodos de análisis de poliaminas, deben ser específicos, sensibles, y simples respecto al tiempo y costo.

En el estudio de las poliaminas, se han empleado una gran diversidad de métodos analíticos, y estos han evolucionado por etapas.

2.1.1 PRIMERA ETAPA.

La espermina fue descubierta en forma de cristales por Antonio Van Leeuwenhoek (mas tarde se supo que eran fosfatos de esta poliamina), por lo tanto, la cristalización, se convirtió en el método preferido por los primeros investigadores en este campo. Rosenheim, empleó picratos y flavianatos como derivados de poliaminas para determinaciones cualitativas (21). Los picratos se identificaban por su punto de fusión y se cuantificaban por procedimientos gravimétricos alcanzando una sensibilidad de milimoles.

2.1.2 SEGUNDA ETAPA.

Una mejora muy importante se introdujo cuando Rosenthal y Tabor (22), emplearon la cromatografía de intercambio iónico (CII) en papel para la separación de poliaminas. Esto permitió la determinación de poliaminas en un rango de nanomoles con bastante especificidad, pero con la desventaja de ser un procedimiento muy tedioso.

Otros métodos de sensibilidad parecida son la electroforésis y la cromatografía en papel. La primera fue muy empleada debido a su gran simplicidad. Inicialmente descrita por Herbst y Fisher, la electroforésis fue modificada por Raina y Cohen (7), quienes utilizaron ninhidrina para las determinaciones cuantitativas. Por otro lado, la cromatografía en papel tiene la ventaja de facilitar el empleo simultáneo de varios solventes, como resultado, el riesgo de obtener resultados falsos debidos al traslape de los puntos, fue reducido.

En esta segunda etapa, surgen además de los métodos químicos, los métodos biológicos que utilizan características específicas de las poliaminas para su determinación. En esta etapa, los métodos biológicos están representados por los métodos enzimáticos. Uno de estos, emplea espermidina oxidasa de Serratia marcescens para producir Δ^1 pirrolina a partir de espermina y tiene una sensibilidad de 0.05 a 0.4 μ moles (23). Otro método enzimático, se basa en la oxidación de espermidina y espermina por una aminooxidasa sérica pero también es poco sensible ya que solo permite la determinación de 0.01 μ mol como sensibilidad máxima (24).

2.1.3 TERCERA ETAPA. METODOS MODERNOS,

En 1965 Seiler y Wiechmann desarrollaron un método sensible para la determinación de poliaminas. En este método, los derivados de dansilo de las poliaminas son separados por cromatografía de capa fina (CCF) en sílica gel y determinados fluorométricamente (25). Además de tener una sensibilidad de 20 a 200 pmoles, este método facilita la identificación de poliaminas. Los derivados de dansilo extraídos de los puntos del cromatograma, también pueden ser analizados por espectrometría de masas. Estudios muy sofisticados como la determinación de poliaminas en el tRNA y en partículas virales (26) han sido posibles gracias a este método.

Russell reportó en 1971, la excreción de poliaminas en la orina de pacientes cancerosos, y esto impulsó el desarrollo de nuevos procedimientos (13).

El analizador de aminoácidos se volvió una herramienta muy útil debido a la automatización del procedimiento; aunque es un método moderadamente sensible, su desventaja es el alto costo del instrumento y de su mantenimiento (21).

La determinación se hizo más sensible por un procedimiento en el que las poliaminas se separaban automáticamente por el analizador de aminoácidos y eran determinadas fluorométricamente usando o-ftalaldehído (OFA) en lugar de ninhidrina (4). Esta modificación es diez veces más sensible que el método original. También se inició el empleo de fluorescamina y de cloruro de dansilo para mejorar la sensibilidad de la detección (27).

La cromatografía de gas-líquido (CG) fue introducida por Smith para determinar putrescina en extractos de plantas (28).

Este tipo de cromatografía requiere de procedimientos de purificación muy extensos que lo hacen poco práctico para el análisis de rutina. Aunque inicialmente la cromatografía de gas era poco sensible, la síntesis de algunos derivados volátiles de las poliaminas han mejorado la sensibilidad. Se ha reportado la separación por cromatografía de gas de derivados trifluoroacetilados (29), pentafluorobencilados (30), de isobutiloxicarbónilo (31) y de pentafluoropropionilo (32) de las poliaminas.

Una mejora muy importante de la cromatografía de gas es sin duda la combinación con la espectrometría de masas (CG-EM) que empleando análogos deuterados de las poliaminas como referencia alcanza una sensibilidad de picomoles.

La cromatografía líquida de alta presión (CL-AP), es una alternativa muy importante ya que tiene la ventaja de ser mas rápida y en algunos casos mas sensible. Existen una gran cantidad de métodos de CL-AP que emplean una gran variedad de derivados de las poliaminas . Entre los principales agentes formadores de derivados para este tipo de cromatografía se encuentran: el o-ftalaldehído (OFA), la fluoescamina, el mercaptoetanol, el cloruro de tosilo, el cloruro de dansilo, la ninhidrina, el cloruro de benzoilo, el cloruro de dabsilo y el etanotiol.

En esta tercera etapa, los métodos biológicos se ven mejorados con la aparición de los métodos inmunológicos . Quash y col. fueron los primeros en crear anticuerpos contra poliaminas. Ellos emplearon poliaminas como haptenos ligados a proteínas. Los anticuerpos así obtenidos, se hacen

reaccionar con poliaminas presentándose una inhibición del crecimiento de diversas células en cultivos tisulares. Desafortunadamente, se observa una reacción cruzada entre las diferentes poliaminas imposibilitando su uso en procesos analíticos precisos (21).

Bartos (33) también empleó anticuerpos antipoliámínicos en un Radioinmunoensayo (RIE) muy sensible; la prueba es muy sensible y se pueden analizar muchas muestras en poco tiempo, pero también se presenta la reacción cruzada entre los anticuerpos.

Se ha descrito un procedimiento para la purificación de los anticuerpos antipoliámínicos por cromatografía de afinidad. De este modo, se incrementa la sensibilidad y se disminuye la reacción cruzada permitiendo la determinación de 0.05 pmoles de poliaminas en sangre (34).

También se emplea un método inmunofelométrico que se basa en el enlace covalente de los anticuerpos antipoliámínicos con esferas de látex como método para aislar las poliaminas (35).

Los métodos enzimáticos se han mejorado considerablemente. Se ha desarrollado un método que determina el CO_2 producido enzimáticamente a partir de putrescina y otro proceso para determinar el peróxido de hidrógeno formado por putrescina oxidasa, ambos métodos tienen una sensibilidad de picomoles.

La tabla 2.1 resume los principales métodos para la determinación de poliaminas.

TABLA 2.1
METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE POLIAMINAS

METODO	DERIVADO	TIEMPO prep./anal.	SENSIBILIDAD picoles	RECUPERACION (%)	REF.
CCF	danilo	12h/210m	20-200	80-100	12
CA	danilo	12h/12m	3	n.r.	36
CII	ninhidrina	20h/95m	1000-2000	100	37
	OFA	24h/120m	100-200	98	4
	fluorescamina	n.r.	200	n.r.	27
CG		n.r.	100 000	n.r.	28
	N-TFA	n.r.	200-600	55-90	2,14
	N-BOC	19h/35m	6000	94-99,6	31
	FFP	n.r.	10	73	32
CG-DM	N-TFA	n.r.	1	98	38
	N-PM	n.r.	n.r.	n.r.	39
CLAP	tosilo	n.r.	5000	n.r.	9
	benzoilo	2h/16m	200	n.r.	17
	danilo	25m	25-50	73	9
	cabilo	2h/14m	20	84-93	40
	fluorescamina	20m	5	n.r.	41
	OFA	n.r.	5	n.r.	42
	merceptoetanol	n.r.	3-5	n.r.	43
	etanotiol	2,5h	0,5	n.r.	44
	danilo	28m	0,025	n.r.	45
ENZIMATICO	FORMACION DE CO ₂	5m	20	90-100	46
	FORMACION DE H ₂ O ₂	15m	5	n.r.	47
INMUNOLOGICO	látex	n.r.	1-10	n.r.	48
	radiactivos	n.r.	0,05	n.r.	49

CAPITULO III. EXTRACCION Y PURIFICACION DE POLIAMINAS.

3.1 METODOS DE EXTRACCION.

Los primeros métodos para el aislamiento y purificación de poliaminas, se basan en la baja solubilidad de algunos de sus derivados, tales como fosfatos, picratos, cloroauratos y flavianatos. Al principio, estos fueron cristalizados como sales de espermina exclusivamente, por lo tanto no eran aplicables a la espermidina ni a las diaminas. En la actualidad, se conocen las propiedades de casi todos los derivados de las diaminas y poliaminas (tabla 3.1).

La destilación de vapor en condiciones alcalinas se utilizaba para separar poliaminas de componentes no volátiles. Actualmente, las poliaminas totales, pueden extraerse del material biológico por calentamiento con ácido acético, ácido perclórico, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético y ácido sulfosalicílico, o bien por extracción con solventes como butanol o tolueno, lo que permite su posterior separación e identificación por diversos métodos.

Los métodos de extracción, por lo general se combinan con métodos de separación cromatográfica para lograr una mayor pureza en las muestras y por consiguiente, mejores resultados en la cuantificación.

3.1.1 EXTRACCION CON ACIDO PERCLORICO.

El ácido perclórico, se emplea para extraer y desproteinizar muestras de material biológico y plantas antes de ser sometidas a cualquier método para cuantificar poliaminas.

TABLA 3.1
LAS POLIAMINAS Y SUS DERIVADOS

COMPUESTO	FORMULA	PROPIEDADES
ESPERMINA	$C_{10}H_{26}N_4$	Cristales en forma de aguja; soluble en agua, butanol, etanol; insoluble en éter y benceno.
Fosfato	$C_{10}H_{26}N_4 \cdot 2H_3PO_4 \cdot 6H_2O$	AGUAS LARGAS SOLIBLES EN AGUA CALIENTE, ACIDOS Y ALCALIS.
Clorhidrato	$C_{10}H_{26}N_4 \cdot 4HCl$	AGUAS FRISMAICAS MUY SOLIBLES EN AGUA Y NO SOLIBLES EN ACETONA, ETHER Y CLOROFORMO.
Picrato	$C_{10}H_{26}N_4 \cdot 4C_6H_3O_7N_3$	AGUJAS AMARILLAS.
ESPERMIDINA	$C_7H_{19}N_3$	
Fosfato	$C_7H_{19}N_3 \cdot 3H_3PO_4 \cdot 6H_2O$	HEJUELAS BLANCAS SOLIBLES EN AGUA E INSOLIBLES EN ETANOL.
Clorhidrato	$C_7H_{19}N_3 \cdot 3HCl$	HEJUELAS BLANCAS SOLIBLES EN AGUA.
Picrato	$C_7H_{19}N_3 \cdot 3C_6H_3O_7N_3$	AGUAS AMARILLAS.
PUTRESCINA	$C_4H_{12}N_2$	Líquido; soluble en agua, ligeramente soluble en éter.
Clorhidrato	$C_4H_{12}N_2 \cdot 2HCl$	AGUAS NO HIGROSCOPICAS SOLIBLES EN AGUA E INSOLIBLES EN ETANOL Y EN ETHER.
Dipicrato	$C_4H_{12}N_2 \cdot 2C_6H_3O_7N_3$	CRISTALES DORADOS.
CADAVERINA	$C_5H_{14}N_2$	LIQUIDO INSOLUBLE EN ETANOL Y ETHER SOLUBLE EN AGUA.
Clorhidrato	$C_5H_{14}N_2 \cdot 2HCl$	PRISMAS HIGROSCOPICOS . SOLUBLE EN ETANOL.

Algunas muestras biológicas como la orina, no son purificadas suficientemente por la precipitación con ácido perclórico; en estos casos es necesaria una hidrólisis ácida posterior a la desproteínezación, especialmente si se trata de aminor acetiladas (41).

3.1.1.1 EXTRACCION DE POLIAMINAS EN TEJIDOS CON ACIDO PERCLORICO.

- Los órganos o tejidos son separados rápidamente y colocados en un vaso homogenizador previamente tarado.
- Se adiciona ácido perclórico 0.3 N (1 ml/100 mg de peso húmedo) con cantidades apropiadas de estándares internos.
- Se homogeniza a 4°C.
- Se centrifuga a 3500 rpm durante 15m y el sobrenadante se usa como muestra(41).

3.1.1.2 EXTRACCION DE POLIAMINAS EN SUERO CON ACIDO PERCLORICO.

- Se mezclan de 0.5 a 1 ml de suero con estándares internos y se desproteínan con ácido perclórico 1.5 N hasta una concentración final de 0.3 N.
- Se centrifuga la suspensión y se emplea el sobrenadante como muestra(41).

3.1.1.3 EXTRACCION DE POLIAMINAS EN PLANTAS SUPERIORES CON ACIDO PERCLORICO.

- Se separa el tejido vegetal, se homogeniza y se extrae con ácido perclórico al 5% (1 ml/100 mg) y se somete a un baño de hielo por una hora.
- El sobrenadante que contiene la fracción poliamínica, se almacena a -20°C en recipientes de plástico, ya que se ha observado cierta tendencia de las poliaminas a unirse a los recipientes de vidrio (17).
- Bajo estas condiciones, el extracto poliamínico permanece estable por

mas de seis meses.

3.1.2 EXTRACCION CON BUTANOL.

Uno de los métodos mas empleados es el citado por Raina en 1964. En este método, las poliaminas, se extraen con n-butanol de extractos tisulares libres de proteína y se determinan colorimétricamente con ninhidrina después de ser separadas por electroforesis .

Este método es aplicable a la determinación simultánea de putreacina, espermidina y espermina en muchas muestras, pero la extracción con butanol no es muy satisfactoria ya que la recuperación de las poliaminas es muy variable (51).

Recientemente se han hecho modificaciones al método original a fin de poder complementarlo con la cromatografía de gas-líquido (52).

Se ha observado la presencia de sales inorgánicas disueltas contaminando el extracto butanólico. Probablemente son estas sales las que determinan una adsorción variable e inespecífica de las poliaminas que origina una recuperación baja e inconstante.

La modificación mas importante a la extracción con butanol es la que especifica un lavado suave del extracto con una solución saturada de sulfato de sodio y una extracción doble con butanol que elimina las sales por completo sin una pérdida apreciable de poliaminas. De esta manera se consiguen recuperaciones tan buenas y constantes como las reportadas por otros métodos (51).

3.1.2.1 EXTRACCION DE POLIAMINAS EN TEJIDOS ANIMALES CON BUTANOL.

- Los órganos son separados y homogenizados con agua destilada a una concentración de 20% (P/V). La temperatura debe mantenerse entre 0 y 4°C.
- Se toman 10 ml de tejido homogenizado y se tratan con un volumen igual de ácido perclórico al 6%.
- El precipitado se lava dos veces con 5 ml de ácido perclórico al 3%. Los lavados se combinan con el sobrenadante y se alcalinizan con KOH 4N.
- El perclorato de potasio precipita por centrifugación. El precipitado se lava dos veces con NH₄OH 2N. (2 ml cada vez).
- El sobrenadante y los lavados combinados (pH 13) se saturan con sulfato de sodio y se extraen durante 30 m con 10 ml de 1 butanol. Este paso se repite tres veces para mejorar la recuperación total de las poliaminas.
- El extracto butanólico (30 ml) se agita suavemente con 10 ml de solución saturada de sulfato de sodio y se centrifuga para separar las sales inorgánicas en la fase acuosa.
- La fase butanólica se suplementa con una cantidad exacta de éter dietílico que contenga D-anfetamina y benzoanfetamina como estándares internos. Se evapora a sequedad a 60°C al vacío.
- El residuo seco (consistente en estándares, diaminas, poliaminas y una pequeña cantidad de sales inorgánicas) se re-extrae con 20 ml de 1 butanol y se eliminan las sales por centrifugación.
- La parte clara del extracto butanólico se evapora hasta casi 20 µl que se emplean para la determinación cuantitativa (51).

La mayoría de las veces, la extracción butanólica se hace después de una hidrólisis ácida con el fin de mejorar la extracción y concentración de

las poliaminas.

3.1.3 EXTRACCION CON ALCOHOL ISOAMILICO.

El alcohol isoamílico se usa en lugar de butanol en los casos en los que existe la posibilidad de que el material biológico forme una emulsión al reaccionar con butanol.

El alcohol isoamílico y el butanol tienen el mismo grado de extracción.

Por otro lado, el alcohol isoamílico es menos miscible en agua que el n-butanol y por ende mas fácilmente evaporable (53).

3.2 METODOS DE HIDROLISIS.

Algunas muestras biológicas, como la orina y el fluido amniótico, tienen un contenido muy bajo de poliaminas libres (menos de 25 pmol/ml) y por lo tanto, su detección se hace difícil(54).

En algunos estudios, la filtración en Sephadex G-25 y G-15 ha sugerido un peso molecular de las poliaminas muy superior al real (55); esto se atribuye a la interacción de las poliaminas con especies macromoleculares pequeñas con pesos moleculares que oscilan entre 1 000 y 10 000 (55). Por lo tanto, se recurre a una hidrólisis ácida para liberar a las poliaminas de los complejos en los que se encuentran, aumentando la concentración de poliaminas libres y facilitando su determinación.

3.2.1 HIDROLISIS DE URINA CON ACIDO CLORHIDRICO.

- Se toma un volumen de 25 ml de orina y se evapora a sequedad a 60°C.
- Al residuo, se le adicionan 25 ml de HCl 6N y la solución se somete a reflujo durante 16 h a 110°C.

-La solución se coloca en refrigeración a 4°C toda la noche y el precipitado resultante se filtra en un papel Whatman 30 (se pueden obtener resultados diferentes si no se elimina cualquier residuo formado durante la hidrólisis).

- El filtrado se evapora a sequedad y el residuo se redissuelve en agua hasta 5 ml. De esta, se toma la muestra (31).

En ocasiones, para evitar la interferencia del amoníaco presente en la orina con los derivados de poliaminas empleados en la determinación, es preciso eliminar el amoníaco ya sea por un tratamiento e incubación con ureasa seguido de una aereación previa a la hidrólisis, o bien por secado en medio alcalino (12).

3.2.2. HIDROLISIS DE FLUIDO AMNIOTICO CON ACIDO CLORHIDRICO.

- Las muestras se obtienen por aspiración transplacentaria en mujeres con 34 a 38 semanas de embarazo.

- Se centrifugan inmediatamente a 2000 X g a 4°C en una centrifuga refrigerada durante 30 m.

- El sobrenadante puede congelarse a -25°C si ha de usarse después. Si se va a usar inmediatamente, se liofiliza a sequedad.

- Se redissuelve en 4 ml de HCl 6N.

- Se burbujea con N₂ durante 20 m y se sellan los tubos.

- Se efectúa la hidrólisis a 110°C durante 24 h.(54).

3.3 METODOS DE DESPROTEINIZACION.

3.3.1 DESPROTEINIZACION CON ACIDO TRICLOROACETICO.

El tratamiento con ácido tricloroacético es básicamente una eliminación de proteínas por precipitación. Se emplea en muestras como semen, órganos, tejidos y microorganismos .

Cuando se pretende determinar poliaminas en semen, es un prerequisite desproteínizar la muestra lo mas pronto posible después de la eyaculación, ya que cuando las poliaminas no son eliminadas rápidamente, se observa una disminución en el contenido de espermidina y espermina , debido a la elevada actividad de las aminooxidasas que se sabe están presentes en muestras como semen humano (Tabla 3.2) (56).

TABLA 3.2
POLIAMINAS EN SEMEN HUMANO (nmol)

	ESM	ESD	PUT
Desproteínización retrasada	2 082	132	418
Desproteínización inmediata	6 450	261	123

(56)

3.3.1.1 DESPROTEINIZACION DE SEMEN CON ACIDO TRICLOROACETICO.

- El semen se trata con un volumen igual de ácido tricloroacético(TCA) frío al 50%.
- Se centrifuga a 7 000 X g durante 10 m.
- El sobrenadante se utiliza en la separación cromatográfica (56).

3.3.1.2 DESPROTEINIZACION DE UN CULTIVO DE E.coli CON TCA.

- El microorganismo se deja crecer hasta una densidad de 3.3×10^8 células/ml en 50 ml de medio de fosfatos.
- Se colecta y se extrae durante 2 h con 5 ml de TCA al 10% a 0°C.
- El extracto se centrifuga y el fluido sobrenadante se extrae tres veces con tres volúmenes de éter dietílico. El residuo etéreo se evapora al vacío.
- El análisis puede efectuarse con 0.3 ml de este extracto (equivalente a 10^9 células) en un volumen final de 1 ml (36).

3.3.2 DESPROTEINIZACION CON ACIDO SULFOSALICILICO.

Las muestras que han sido sometidas a hidrólisis ácida no son satisfactorias para algunos métodos que emplean purificación con resinas, ya que la elevada fuerza iónica del hidrolizado, afectaría adversamente la retención de las poliaminas en la resina durante la fase de preconcentración y separación de grupos.

La hidrólisis de muestras ricas en proteína, también produce péptidos de una longitud suficiente como para evitar la concentración cuantitativa de las poliaminas en el cartucho o columna.

La extracción de poliaminas mediante n-butanol controla efectivamente la fuerza iónica de la muestra, pero toma mucho tiempo y no elimina a los aminoácidos de la muestra.

La desproteínización con ácido sulfosalicílico seguida de una hidrólisis con hidróxido de bario, es un buen procedimiento de extracción en estos ca-

sos, ya que después de la hidrólisis, el hidrolizado se neutraliza con ácido sulfúrico, formándose sulfato de bario insoluble, lo que evita que la solución final tenga una fuerza iónica muy elevada. El sulfato de bario fresco co-precipita con otros compuestos, entre ellos, cerca de la mitad de las poliaminas, por lo que se ha encontrado que dejando reposar el precipitado toda la noche antes de retirar el sobrenadante, se evita este tipo de pérdida de las poliaminas (57).

3.3.2.1 DESPROTEINIZACION DE ORINA CON ACIDO SULFOSALICILICO.

- Se hace una prueba de proteína con unos pocos cristales de ácido sulfosalicílico. Si se forma un precipitado:

- Desproteínizar con 100 mg de ácido sulfosalicílico, 10 ml de orina, mezclar y centrifugar.

- Para determinar poliaminas libres, se adicionan 0.3 ml de citrato a 3 ml de orina o sobrenadante desproteínizado y se ajusta el pH a 3-4 con NaOH 0.1M o solución de HCl (57).

- Para poliaminas totales, se hidroliza la muestra de la siguiente manera: A 5 ml de orina desproteínizada, se adiciona 1 gr de hidróxido de bario, se mezcla y se calienta por 4 h a 100°C en un baño de aceite.

Se enfría y se adicionan 2 ó 3 gotas de solución de fenolftaleína y se neutraliza adicionando lentamente HCl concentrado hasta la desaparición del color rosa.

Se deja reposar a temperatura ambiente durante 24 h y se centrifuga. A 3 ml del sobrenadante, se adicionan 0.3 ml de citrato y se ajusta el pH a 3 ó 4 (57).

3.3.2.2 DESPROTEINIZACION DE SANGRE CON ACIDO SULFOSALICILICO.

- Se adiciona una gota de Tritón X-100 a 1 ml de sangre y se agita con ultrasonido para efectuar la hemólisis.
- Se adicionan 9 ml de solución de ácido sulfosalicílico. Se mezcla y centrifuga.
- El sobrenadante, se trata de acuerdo al procedimiento descrito para la orina (57).

3.3.2.3 DESPROTEINIZACION DE SUERO O PLASMA CON ACIDO SULFOSALICILICO.

- El procedimiento es igual que para muestras de sangre, a excepción de la hemólisis, que es omitida en este caso.
- Con 1ml de suero se efectúa la desproteínización de la misma forma. Si se dispone de 2 ml de suero se emplean 8 ml de ácido sulfosalicílico (47).

3.4 METODOS DE ANTICOAGULACION.

La anticoagulación de muestras de sangre , se consigue con citrato de sodio (23 mg/dl ; 0.1 ml/10 ml de sangre).

Para el fraccionamiento de células sanguíneas se utiliza heparina sódica (1000 U/ml ; 0.1 ml / 10 ml de sangre). El fraccionamiento celular se emplea en los casos en los que se desea determinar poliaminas en las células sanguíneas (3).

3.5 MÉTODOS DE PURIFICACION.

La purificación sigue a la extracción de poliaminas y tiene por objeto, la concentración de éstas de las muestras de tejidos y fluidos fisiológicos, así como el mejoramiento de las separaciones cromatográficas subsiguientes.

Durante la purificación de las muestras se separan los aminoácidos presentes, disminuyendo el tiempo en columna necesario para eliminarlos (56).

La purificación, también sirve para separar diaminas de poliaminas y evitar así posibles interferencias entre ellas (41).

La mayor parte de los procesos de purificación, consisten en separaciones por cromatografía de intercambio iónico en una gran variedad de resinas, aunque también pueden lograrse por cromatografía de capa fina pero con menor eficiencia.

La cromatografía de intercambio iónico, puede constituir en sí misma, un método analítico de poliaminas si es combinada con algún medio de detección como ninhidrina u OFA (4,51,54,58) o bien, ser utilizada simplemente como un proceso de purificación.

3.5.1 PURIFICACION POR INTERCAMBIO IONICO.

La cromatografía de intercambio iónico es un tipo de cromatografía de adsorción en la que la separación se produce por diferencias en las fuerzas de adsorción de tipo electrostático entre los diferentes componentes de la muestra y de la fase estacionaria.

Los componentes se separan de la columna mediante un tratamiento de elución que puede ser de tres tipos: elución sencilla o isocrática, elución por pasos y gradiente de elución (27,54,58,59).

Para desarrollar un procedimiento altamente sensible para la determinación de poliaminas, es esencial contar con un método eficiente de purificación y concentración en el que grandes cantidades de poliaminas sean adsorbidas y eluidas en el volumen más pequeño posible. Lo ideal, es obtener una alta recuperación en un solo paso.

El cuadro 3.2 describe algunas de las condiciones y resinas de intercambio iónico más empleadas para la purificación de poliaminas.

TABLA 3.2

RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO EMPLEADAS EN LA PURIFICACION DE POLIAMINAS

TIPO DE RESINA	TIPO DE ELACION	RECUPERACION	REF.
DOWEX 50 W- X8 (200-400)	Isocrática con HCl 2N ó 6N	n.r.	9,60
DOWEX 50 W	Gradiente de HCl 1 a 6N	95%	51
AMBERLITA CG-120	Gradiente de HCl	n.r.	31
POROPAK Q - DOWEX 50 X2	Gradiente de HCl	79%	32
ZEOKARB 225	Gradiente de NH ₄	93%	28
DOWEX 50W X-4(200-400)	Gradiente de KCl	90-98%	4
DEAE-Sephadex A-25	Gradiente de NaCl en K ₂ PO ₄	n.r.	54
Sílica Gel Sep-pak	Isocrática con HCl 0.1N	n.r.	61
Sílica Gel (60-200)	Por pasos con H ₂ O y HCl 0.3N	82.5%	60,62
Bio-Rex 70	Por pasos con H ₂ O y HCl 0.1M	100%	58
Bio Gel P ₂	Isocrática con formato de resaca 0.15M	76%	59
Carboximetilcelulosa 22	Gradiente de piridina/ ácido acético	95-100%	41

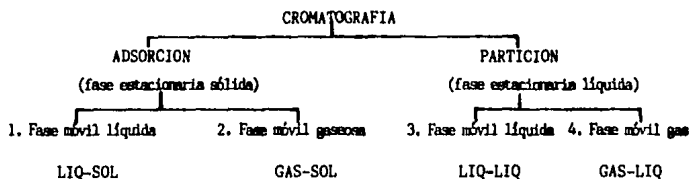
n.r. No reportado.

CAPITULO IV. MÉTODOS CROMATOGRAFICOS.

4.1 CLASIFICACION.

Los métodos cromatográficos, se clasifican por la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido (cromatografía de adsorción) o un líquido (cromatografía de partición) y las fases móviles pueden ser líquidas o gaseosas (fig. 4.1).

FIG. 4.1 CLASIFICACION DE LOS METODOS CROMATOGRAFICOS



(63).

Existen algunas variantes a los cuatro tipos principales de cromatografía:

1. Cromatografía Líquido-Sólido

- Cromatografía clásica de adsorción *
- Cromatografía de intercambio iónico*
- Cromatografía de capa fina *
- Cromatografía de exclusión
- Cromatografía líquida de alta presión*

2. Cromatografía Gas-Sólido

3. Cromatografía Líquido-Líquido

-Cromatografía en papel *

-Cromatografía de fase ligada (de alta presión)

4. Cromatografía Gas-Líquido

-Cromatografía de Gas-Líquido *

-Cromatografía de columna capilar

4.1.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDO-SOLIDO.

La cromatografía líquida, ha estado presente en la evolución de los métodos analíticos de poliaminas.

Tabor y Tabor, en uno de sus trabajos iniciales, utilizaron el intercambio catiónico para absorber estos compuestos y separarlos como un grupo.

Posteriormente fueron separadas unas de otras también por intercambio catiónico y cuantificadas por su reacción con ninhidrina (27,64), fluorescamina (4) y OFA (65,66).

Se ha implementado el uso de analizadores automáticos de aminoácidos para la determinación de poliaminas, ya que las diaminas son mas fuertemente retenidas que los aminoácidos y es posible eluirlos con amortiguadores fuertes a pH elevado.

* METODOS REPORTADOS EN LA DETERMINACION DE POLIAMINAS.

4.1.1.1 FORMACION DE DERIVADOS PARA CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

Las características estructurales de las poliaminas son poco favorables para su detección por métodos ópticos o electroquímicos. Por lo tanto, es necesario hacerlas reaccionar con ciertas sustancias para formar derivados detectables por sus altos coeficientes de extinción molar o por su intensa fluorescencia (36).

Entre la gran variedad de reactivos posibles, se han sugerido varios cloruros de ácidos, entre los que figuran: cloruro de benzoilo, cloruro de p-toluensulfonilo, cloruro de quinolina-8-sulfonilo, cloruro de 5-dimetilamino naftaleno-1-sulfonilo (cloruro de dansilo) y cloruro de 5-di-n-butilamino naftaleno-1-sulfonilo (60).

Además de los cloruros, también se emplean fluorescamina y OFA en presencia de 2-mercaptoetanol en la formación precromatográfica de derivados. Estos dos últimos reactivos, reaccionan solamente con grupos amino primarios, en contraste con los cloruros que forman derivados con los grupos amino primarios y secundarios y además con imidazol, nitrógeno, hidróxidos fenólicos y aún con alcoholes.

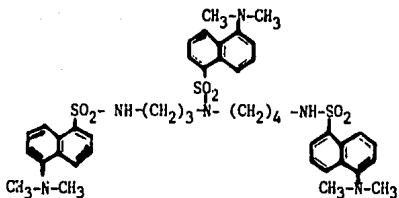
Los cloruros de ácidos no difieren mucho en reactividad, por lo que se aplican los mismos principios de formación para todos. La reacción ocurre en medio alcalino y con solventes orgánicos. La máxima sensibilidad se consigue con un pH de 10,5 (36). Las condiciones son similares para la reacción con fluorescamina.

Los reactivos deben aplicarse en exceso para obtener una reacción cuantitativa con todos los grupos amino de las poliaminas. Posteriormente, es recomendable retirar el reactivo excedente, haciéndolo reaccionar con prolina (12,25).

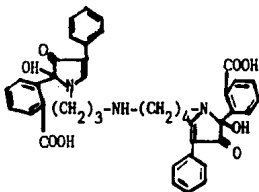
La formación de derivados puede hacerse antes o después de la cromatografía sin embargo se prefiere hacerla antes de la separación cromatográfica debido a que la solubilidad de los derivados en solventes orgánicos, permite su extracción de fases acuosas, logrando así la concentración de poliaminas de grandes volúmenes de extractos de tejidos y fluidos corporales (60). No obstante, la conjugación post-cromatográfica también se emplea debido a la limitada estabilidad de algunos derivados, principalmente de OFA-2-mercaptoetanol. La estabilidad puede mejorarse empleando etanotiol en lugar de 2-mercaptoetanol (66).

Aunque los derivados mas empleados hasta la fecha son los cloruros de dansilo, hay algunos motivos que hacen mas deseable la utilización de otros derivados. Por ejemplo, los derivados de dansilo son altamente fluorescentes, y la intensidad de su fluorescencia es modificada considerablemente por factores ambientales como temperatura, pH, polaridad del solvente y exposición a la luz; mientras que otros derivados como los de cloruro de dansilo son visibles y fotoestables, por lo tanto, su detección espectrofotométrica se hace en la región visible (425 nm) sin importar la interferencia de otras sustancias en la muestra con la absorción ultravioleta (40).

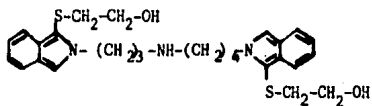
Además, los derivados dansilados, son resueltos por sistemas de gradiente



TRI- DANSIL ESPERMIDINA



DERIVADO DE FLUORESCAMINA



DERIVADO DE OFA

Fig.4.1. Estructuras de los principales derivados de la Espermidina .

de elución muy complejos, mientras que los derivados de cloruro de benzoilo o dabsilo, emplean sistemas de elución isocráticos mas simples, fáciles de operar y con mayor estabilidad en su línea basal (40,67).

En la figura 4.1 se presentan las estructuras de los principales derivados de la espermidina.

4.1.1.2 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Esta técnica, depende del intercambio de iones entre al fase móvil y los sitios iónicos del empaque de la columna. El proceso de intercambio iónico, se esquematiza en la figura 4.2.

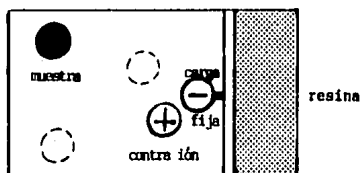


FIG. 4.2 INTERCAMBIO IONICO (68).

Para elegir el tipo de resina de intercambio iónico, debe considerarse en primer lugar, la carga de la muestra, el pH requerido para el enlace y por último, el peso molecular de la muestra (69).

De este modo, la resina de intercambio iónico mas apropiada para la separación de poliaminas es un intercambiador catiónico fuerte y de porosidad baja.

Las principales resinas de intercambio catiónico, son del tipo: carboximetilo (CM^-), fosfato (P^-) o sulfopropilo (Sp^-). En la determinación de poli-

aminas, se han empleado resinas de tipo carboxílico , pero no se ha obtenido una separación satisfactoria. Es por esto que se recurre mas a menudo al empleo de resinas sulfónicas que en combinación con amortiguadores de citrato, posibilitan una adecuada separación de las poliaminas, unas de otras y de los aminoácidos básicos (36).

Actualmente, la mayoría de las columnas de intercambio iónico para determinar poliaminas, se encuentran adaptadas a un analizador automático de aminoácidos, lo que automatiza y hace mas sencillo y rápido el procedimiento (36,54,56,57,65,66,70,71).

Para separar a las poliaminas de la columna, casi siempre se emplean sistemas de gradiente de elución de tres o mas amortiguadores, por lo general de citrato de sodio o potasio y cloruro de sodio o potasio en concentraciones cada vez mayores , de manera que se establezca un gradiente de pH y de fuerza iónica.

A un pH 6-6.32 correspondiente a una concentración 0.3 M de Na^+ o K^+ , se eluyen los aminoácidos básicos, a un pH de 4.68 correspondiente a una concentración 2 ó 3M de Na^+ o K^+ , eluyen las poliaminas (72).

Algunos autores consideran mas apropiados los amortiguadores de sodio que los de potasio , debido a que su fuerza iónica es menor y esto disminuye la posibilidad de colapso de la resina y facilita la separación de los aminoácidos de las poliaminas. No obstante, se ha observado que el uso de amortiguadores de potasio acorta los tiempos de elución (72).

Sin embargo, no debe eliminarse por completo el ión sodio ya que se ha observado que en algunas muestras no se obtiene una resolución completa entre agmatina y espermina en ausencia de este ión (37).

La detección de poliaminas, se realiza por métodos colorimétricos con ninhidrina (36,56,57,65,71) o fluorométricos con OFA (4,72) y fluorescamina (4).

El OFA tiene buena solubilidad en agua y es de cinco a siete veces mas sensible que la fluorescamina con espermidina y espermina (4).

La cuantificación de los derivados fluorescentes, se efectúa por su lectura de absorbancia a 280 nm.

Además de la cromatografía de intercambio iónico convencional, se ha reportado para el análisis de poliaminas, el uso de intercambio iónico en papel seguido de una cuantificación con dinitrofluorobenceno. La única ventaja del intercambio iónico en papel sobre el de columna es que no se requiere del delicado control de los sistemas de gradiente de elución ni el uso de un colector de fracciones o de un analizador automático de aminoácidos, ya que la resolución en columna es mucho mejor (73).

4.1.1.3 CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA.

La mayor parte de los estudios sobre la bioquímica de las poliaminas se han basado en el uso de técnicas de separación tales como cromatografía de capa fina, cromatografía en papel o electroforesis. Sin embargo, desde 1973, no ha habido un progreso real en este tipo de separaciones, aún cuando se han implementado placas de alta presión en capa fina, ya que se han desarrollado muchos métodos automatizados mas sensibles (74).

La principal dificultad que se presenta al aplicar la cromatografía en papel y en capa fina en el análisis de poliaminas, es la elevada polaridad de estos compuestos, que hace particularmente difícil su aislamiento de soluciones acuosas que contengan sales, además de que estas aminos y los aminoácidos migran paralelamente, por lo que se requieren separaciones exhaustivas que no es posible obtener por desarrollo unidimensional en capa fina. La electroforesis en capa fina es ligeramente mas ventajosa en este aspecto, ya que si el pH es adecuado, los aminoácidos neutros permanecen cerca del origen, mientras que los aminoácidos y péptidos básicos, migran hacia el cátodo junto con las aminos (74).

Los métodos de cromatografía de capa fina mas empleados, se basan en el método original descrito por Seiler y Wiechmann en 1967, que consiste en la formación de derivados dansilados de las poliaminas y su separación en placas, seguida de la determinación de su intensidad de fluorescencia(12). Este método solo permite la separación de compuestos que reaccionan con cloruro de dansilo y que pueden extraerse de soluciones acuosas a pH 13 (53).

El método original permite el análisis de poliaminas libres y conjugadas. Cuando solo se pretende determinar poliaminas libres, la única modificación es la eliminación de los procesos de hidrólisis.

La extracción de las muestras se hace por lo general con ácido perclórico que asciende por la placa y no interfiere con la determinación (75) o bien con alcohol isoamílico (53).

La extracción de las poliaminas ya dansiladas se realiza con éter (53), benceno (76) o tolueno (77). A menudo se prefiere este último porque evita la migración de las dansilamidas y facilita la aplicación de puntos pequeños (12).

Los derivados dansilados se redisuelven en cloroformo y se aplica 0.1ml de esta disolución a la placa sin tocarla, de preferencia con una micropipeta (12), todo esto con el fin de asegurar una calibración normal y una buena reproducibilidad.

El tipo de placa mas empleado es el de Sílica Gel G-60 con un espesor de 200 a 250 μ m o de Alúmina G.

El sistema de solventes empleado depende del tipo de placa y del compuesto que se desee cuantificar, ya que por ejemplo, con un sistema de dioxano-ácido acético-cloroformo, no se obtiene una separación adecuada de putrescina y amoniaco a menos que la muestra se someta a un tratamiento con ureasa. Con un sistema de dioxano-cloroformo en cambio, se obtiene una clara separación pero este mismo sistema no se recomienda para el análisis de espermina porque no es bien apreciable su separación (53). El método de Seiler y Wiech

mann no permite una separación satisfactoria de la DNS-espermina de otros productos de la dansilación como la DNS-prolina, empleando como solvente una mezcla de cloroformo-trimetilamina (5 : 1) (25).

Algunos sistemas de solventes que son usados comunmente en la separación de poliaminas, se presentan en la tabla 4.1.

TABLA 4.1

SISTEMA DE SOLVENTES	PROPORCIONES	REF.
Cloroformo-Tolueno-Trimetilamina	(60:28:12)	28
Cloroformo-Metanol 28%-Amoníaco	(2:2:1)	78
Etilacetato-Ciclohexano	(2:3) o (1:2)	26,76,79
Dioxano-Ac. acético-Cloroformo	(2:1:97)	53
Diethylén glicol monoetiléter-Ac.-propiónico-Agua	(14:3:3)	74
Cloroformo-Trietilamina	(5:1)	12
Trietanolamina-Isopropanol	(1:4)	5
BIDIMENSIONAL:		
Tricloroetileno-Metanol y	(19:1)	
Cloroformo-Trietilamina	(10:1)	77,80

En la fig. 4.3, se observa una separación cromatográfica de derivados dansilados de las poliaminas en un paciente sano y uno con cáncer uroepitelial en placas de sílica gel y una mezcla de cloroformo-trietilamina como solvente(12).

El desarrollo cromatográfico se detiene cuando el solvente está a 5 mm del extremo superior de la placa (aproximadamente 90 m).

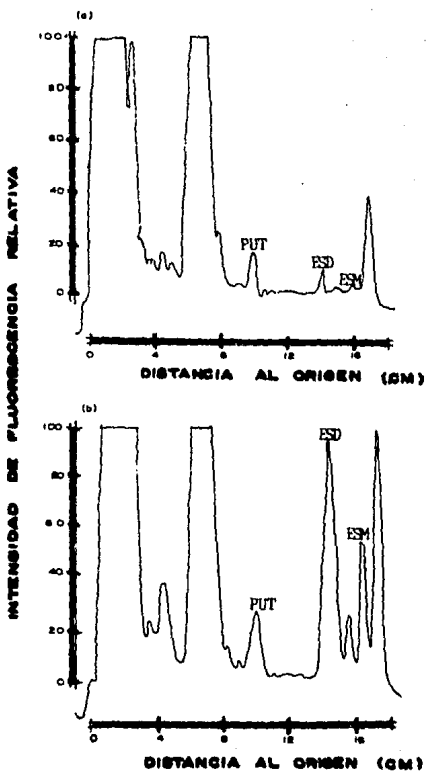


Fig. 4.3 Separación cromatográfica de los derivados dansilados de Putrescina, Espermidina y Espermina contenidos en la orina de : a) Una mujer normal y b) Un paciente con cáncer uroepitelial.

Separación en placas de Sílica Gel 60 con Cloroformo-Trietilamina (5:1) (12).

Para aumentar y estabilizar la fluorescencia de los derivados densificados, se sugiere rociar la placa con 10 ml de Trietanolamina-Propanol 2 (1:4) en aerosol (12). Para este mismo fin, se recomienda secar las placas a vacío durante 16 hr en un desecador que contenga sulfato de calcio anhidro; de este modo, se elimina el agua y otras sustancias volátiles responsables de cierta extinción de la fluorescencia (76).

La detección de las manchas puede hacerse con luz ultravioleta a 366 nm (25) y revelando con ninhidrina o rociando con fluorescamina u OFA. Cuando se emplean estos dos últimos reactivos, se observa un exceso de fluorescencia de fondo y bajos rendimientos en los derivados fluorescentes; para mejorar los rendimientos, se ha ideado una modificación en la que las placas se sumergen en un tanque de fluorescamina, lo que reduce considerablemente la fluorescencia de fondo (74).

Después de la detección, puede procederse a un raspado de la mancha y extracción con etanol seguida de una determinación espectrofotofluorométrica a 350 nm de excitación y 500 nm para la emisión. O bien, puede hacerse una determinación directa de la fluorescencia in situ, evitando el raspado y por lo tanto, posibles pérdidas (76).

Cuando se trata de muestras radiactivas, se extraen siguiendo el procedimiento anterior y se analizan en el espectrofotómetro de centelleo (5).

En 1981, Bardócz empleó placas de intercambio iónico en capa fina con un solvente de fosfato ácido de potasio y cloruro de sodio para separar las poliaminas, complementando con un sistema videodensitométrico para la cuan-

tificación con una sensibilidad de 0.1 nmol (75).

Para la identificación de las dansilpoliaminas separadas por cromatografía de capa fina, la espectrometría de masas, es el método mas apropiado, ya que proporciona información adicional sobre la presencia y tipo de otros compuestos que hayan sido separados por la cromatografía (77).

Muchos métodos proporcionan separaciones satisfactorias de las diaminas y poliaminas mas comunes: PUT, CAD, ESM y ESD. Sin embargo, son pocos los que consiguen separar las poliaminas menos usuales como : sym-noespermidina, sym-homoespermidina, sym-noespermina, termoespermina, canavalamina y caldo pentamina. Con este fin, se ha reportado un método de cromatografía en capa fina que mediante un sistema de solventes de N-butanol-Ac. acético-Piridina-Formaldehído (3:3:2:1), logra la separación de estas poliaminas poco comunes (81).

La tabla 4.2 muestra algunos valores de Rf para diaminas y poliaminas en tres diferentes sistemas de solventes.

TABLA 4.2

VALORES DE Rf PARA ALGUNAS DIAMINAS Y POLIAMINAS

ESTRUCTURA	Rf	
	sistema A	sistema B
$H_2N(CH_2)_4NH_2$ (Putrescina)	0.43	0.62
$H_2N(CH_2)_5NH_2$ (Cadaverina)	0.49	0.58
$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ (Sym-norEsp)	0.15	0.67
$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$ (Espermidina)	0.18	0.50
$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_5NH_2$ (Actinopropil-Cad)	0.22	0.43
$H_2N(CH_2)_4NH(CH_2)_4NH_2$ (Sym-homoEsp)	0.20	0.52

ESTRUCTURA	sistema A	sistema B	sistema C
$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$ (sym-norEsp)	0.04	0.27	0.13
$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$ (Espermina)	0.06	0.26	0.17
$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$ (TerminoEsp)	0.07	0.40	0.18
$H_2N(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$ (Caravaimina)	0.07	0.34	0.22

SISTEMA A : Placas de Sílica Gel 60F-254. Solvente: N-butanol-Ac. acético-Piridina-Agua (3:3:2:1)

SISTEMA B : Placas de Sílica Gel 60F-254. Solvente: N-butanol-Ac. acético-Piridina-Formaldehído (3:3:2:1)

SISTEMA C : Placas de Celulosa. Solvente: Isopropanol-Ac. clorhídrico conc-Agua (8:3:2) (81).

4.1.1.4 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION.

La cromatografía líquida de alta presión, de alta velocidad o cromatografía líquida moderna (CL-AP), ha surgido como un perfeccionamiento de la cromatografía líquida. Consiste en hacer fluir la fase móvil a través de una columna muy delgada mediante la propulsión ejercida por una bomba (69,82). En la fig. 4.4 se esquematizan las partes principales de un cromatógrafo de alta presión.

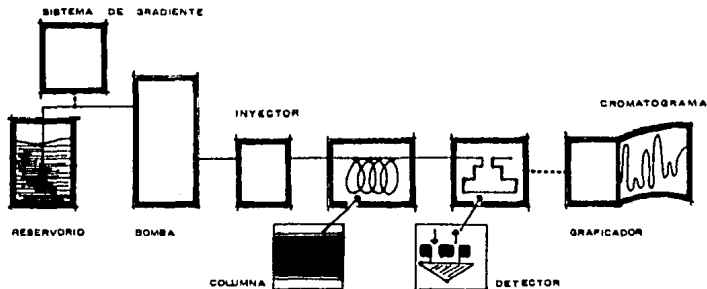


FIG. 4.4. CROMATOGRAFO DE ALTA PRESION (69).

La muestra debe introducirse en la columna con la menor alteración del empaque, para lo que se emplean inyectores, que además permiten controlar el gradiente de solventes, aumentando la reproducibilidad de las condiciones cromatográficas (83).

Por ser una variante de la cromatografía líquida, la alta presión puede aplicarse a la cromatografía de intercambio iónico o a la cromatografía líquida en fase reversa.

Las columnas son casi siempre de acero inoxidable y tienen diámetros internos de 2 a 6 mm; la altura depende del tipo del empaque, si se trata de un empaque de tipo pelicular, la altura típica es de 50 a 100 cm y para materiales porosos de 10 a 30 cm.

Los mejores resultados obtenidos para poliaminas, se han obtenido empacando las columnas con micropartículas menores a 10μ (69).

La mayoría de los métodos de CL-AP reportados para la determinación de poliaminas no requieren purificaciones previas, aunque algunos si la especifican ya sea por intercambio iónico (9,41,61) o por cromatografía en capa fina (84).

Los sistemas de CL-AP pueden funcionar en fase normal o en fase reversa. Las columnas mas empleadas en fase normal son: Porasil (40), Zipax permaphase ETH (9), Spherosil C₁₈ (44), Beckman Ultrasphere (43), Micropak CN 10, Micropak A1-5 (84).

El sistema de CL-AP en fase reversa permite la determinación directa de poliaminas en extractos crudos con buena recuperación y tiempos cortos de análisis (15 m) debido a la eliminación de la pre-purificación. Además, no se presentan problemas de inestabilidad y no se requieren procesos de regeneración después de cada inyección sino hasta después de unas 100 determinaciones (17). Las columnas mas empleadas en fase reversa, son: Brown Lee RP-8 (67), Lichrosorb RP-18 (85), Bondapak RP C₁₈ (45,83), Octadecilsilano RP C₁₈ (17), Vydac RP (41) y Micropak Si 10 (84).

Para la cromatografía de intercambio iónico de alta presión, se han empleado resinas Hamilton CX8 y 62210 F (86).

Para hacer mas durables las columnas en algunos sistemas, la fase estacionaria se ha unido químicamente al soporte inerte, este tipo de cromatografía recibe el nombre de cromatografía de fase ligada. El uso de un gradiente de solventes en una columna de fase ligada (Micropak CN 10) permite el análisis directo de poliaminas de tejidos evitando la purificación (84). Por lo general se emplean para las columnas de fase ligada hidrocarburos sobre un soporte de sílica como Octadecilsilano C₁₈(69).

La cromatografía de pareamiento iónico de alta presión en fase reversa, combina las ventajas de la cromatografía de intercambio iónico y de la fase reversa, haciendo posible el análisis de varias muestras ionizables y también se ha reportado en el estudio de poliaminas (43,45,83). Esta emplea resinas de Bondapak C₁₈ y Ácido octanesulfónico o heptanesulfónico como agente de pareamiento o contraión para aumentar el carácter lipofílico de la muestra y facilitar su retención en la columna no polar de fase reversa (82).

La resolución de poliaminas puede obtenerse por gradiente de elución o por elución isocrática. Aunque el gradiente de elución proporciona una resolución mas rápida, se prefieren los métodos isocráticos por su mayor precisión, ya que las alteraciones de la línea basal y los picos irregulares no se presentan y no es necesario reajustar el equilibrio (69).

La elución isocrática puede usarse si existen diferencias de carácter lipofílico y propiedades de ionización entre los compuestos que se analizan.

La excelente configuración de los picos que resultan de una elución isocrática, permite determinaciones muy sensibles (67). No obstante, existen algunas limitantes como el hecho de que la espermina no se separa del amoníaco con un sistema isocrático de acetona 2% -cloroformo, esto no representa ningún problema en muestras tisulares con escaso contenido amoniacal, pero si es importante en muestras de orina (40) y además, la acumulación de material biológico de las muestras en la columna durante la elución isocrática, en ocasiones requiere la aplicación de un gradiente (44). Este consiste en la aplicación de una concentración mayor del reactivo hasta que la línea basal regrese a su lugar (41).

Los solventes empleados para gradiente de elución, son mezclas graduales de dos sistemas de solventes que por lo general son: ciclohexano/isopropanol, ciclohexano/cloruro de metilo, hexano/amortiguador de sodio en fase normal y metanol/ agua en fase reversa (41,61,85).

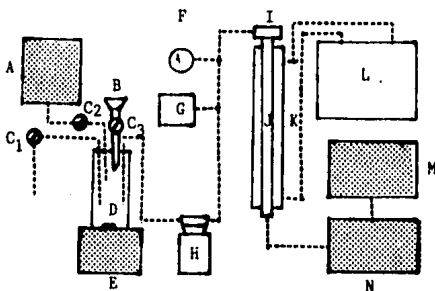
Para la cromatografía de pareamiento iónico en fase reversa se usan solventes polares que consisten en mezclas de acetonitrilo con amortiguadores (45,83,87) (Fig. 4.5).

En la elución isocrática de poliaminas, se emplean : metanol en concentraciones de 70 a 90%, hexano, ciclohexano/cloruro de metilo/isopropanol (17, 40,43,61,84).

La eficacia de las columnas en fase reversa, aumenta con la temperatura por lo que se emplean chaquetas de calentamiento para mantener una temperatura entre 30° y 40° C.

FIG. 4.5

DIAGRAMA ESQUEMATICO DE UN SISTEMA DE GRADIENTE



A, reservorio (75% acetónitrilo); B, embudo; C₁, llaves; D, vaso mezclador; E, agitador; F, válvula de presión (60kg/cm², flujo 0.6ml/m); G, regulador; H, bomba; I, orificio de inyección; J, columna (Zipax P ETH); K, chaqueta; L, circulador de temperatura constante (40°C); M, grabadora y N, detector de UV (254 nm).

1. 25 ml de una solución de acetónitrilo 25% se colocan en el vaso (D) a través del embudo (B).
2. La solución de acetónitrilo se bombea a la columna.
3. Cuando el volumen de ésta ha disminuido 20 ml, se detiene la bomba y se inyecta la muestra.
4. Se cierra la llave C₃ y se abre la C₂ para conectar el vaso con la sol. de acetónitrilo 75% que se encuentra en (A). Se enciende la bomba.
5. Se apaga la bomba cuando termina la separación.
6. Se cierra la llave C₂ y se abren la C₁ y la C₃. El vaso mezclador debe lavarse con acetónitrilo al 25% antes de la siguiente corrida (9).

Algunos métodos de CL-AP , utilizan estándares internos para disminuir los posibles errores en la preparación de la muestra, en el aparato o en la técnica. El estándar está estructuralmente relacionado a una cantidad conocida de muestra , pero tiene un tiempo de retención diferente (69). Los estándares mas comunmente empleados, son las diaminas: 1,3 diaminopropano, 1,4 diaminobutano, 1,5 diaminopentano y 1,6 diaminohexano.

La cuantificación de poliaminas, también se ha hecho por cromatografía de alta presión en capa fina. Con este fin, se han utilizado placas de Sílica Gel 60 en ciclohexano/etil acetato (3:2) que permite una separación limpia de las poliaminas, aunque no se ha comprobado que se reduzca el tiempo de la separación (86).

La cromatografía líquida de alta presión se ha empleado para separar una gran variedad de derivados de las poliaminas: dansilados (45,86), dansilados monoacetilados (61,84), dansilados (68), benzoilados (17,67), tosilados (9) y derivados fluorescentes de OFA (43,44,83) o de fluorescamina (41,85).

4.1.2 CROMATOGRAFIA DE GAS.

La secuencia de la separación cromatográfica es como sigue: 1) Aislamiento de las poliaminas con una columna de intercambio iónico; 2) conversión de las poliaminas a un derivado volátil; 3) la muestra que contiene las poliaminas, se inyecta en un bloque de calentamiento donde se vaporiza instantáneamente y se arrastra como vapor por medio de un gas acarreador hacia la entrada de la columna; 4) las poliaminas, se adsorben en la fase estacionaria de la columna y después son desprendidas al hacer pasar gas acarreador puro; 5) las poliaminas se eluyen sucesivamente en orden creciente de sus coeficientes de partición y entran a un detector conectado a la salida de la columna (88). Estos detectores pueden ser de varios tipos: celdas de conductividad térmica, detectores de ionización de flama o bien detectores por captura de electrones, siendo este último tipo, el mas sensible.

Los cromatógrafos de gas, pueden acoplarse a un espectrómetro de masas para identificaciones mas precisas. Estos dos aparatos permiten también efectuar cuantificaciones por "Selección iónica monitorizada" (SIM), que mide continuamente la corriente iónica en determinadas relaciones de masa/carga de los iones característicos de cada compuesto. Este método ha sido aplicado al análisis de poliaminas con una sensibilidad muy alta (100 f mol

para las diaminas y 1 pmol para las poliaminas) (30,38).

4.1.2.1. FORMACION DE DERIVADOS PARA CROMATOGRAFIA DE GAS.

Aunque la cromatografía de gas está limitada a materiales volátiles, la disponibilidad de cromatógrafos que operan a temperaturas hasta de 450°C y la posibilidad de convertir las poliaminas en derivados volátiles, amplían la aplicación de este método al análisis de poliaminas. Se han empleado una gran variedad de derivados de éstas, principalmente, derivados de trifluoroacetilo (2,14,38,39,89), de trimetilsilicio(29,38), de pentafluoropropionilo (19,32,90), de N-butiloxicarbonilo (31), de etiloxicarbonilo (18), y de N-permetilo (39).

Los resultados obtenidos de estudios de Cromatografía de gas-Espectrometría de masas (CG-EM), demuestran que todos los grupos amino primarios y secundarios, son sustituidos por los grupos formadores de derivados (tabla 4.3).

Los derivados de trifluoroacetilo (TFA) presentan un amplio rango de volatilidad, por lo que se requiere de una temperatura programada de 120°C a 300°C durante 15m. El espectro de las poliaminas trifluoroacetiladas generalmente presenta muchos rearrreglos y fragmentaciones; los iones formados, son fácilmente seguidos por selección iónica monitorizada (38).

La trifluoroacetilación, genera ácido trifluoroacético que cataliza la liberación de los grupos acetilo de las acetil-poliaminas, por lo tanto, si solo se desea determinar poliaminas libres, se debe agregar carbonato de sodio anhidro que mantiene la integridad de las acetil poliaminas (38). La reacción con trimetil silicio no altera los grupos acetilo (28).

· TABLA 4.3

PRINCIPALES DERIVADOS DE LAS POLIAMINAS PARA CROMATOGRAFIA DE GAS

NOMBRE	ESTRUCTURA
TFA espermidina	$\text{CF}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CF}_3-\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CF}_3$
TMS espermidina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{Si}(\text{CH}_3)_2}{\text{N}}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_5$
PFP espermidina	$\text{C}_2\text{F}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_2\text{F}_5-\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_2\text{F}_5$
EOC espermidina	$\text{C}_2\text{H}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_2\text{H}_5-\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_2\text{H}_5$
espermidina N-permetilada	$\text{N}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{CH}_3}{\text{N}}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{CH}_3}{\text{N}}(\text{CH}_3)_2$
N-isoBOC espermidina	$\text{C}_4\text{H}_9-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OC}_4\text{H}_9-\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OC}_4\text{H}_9$

Algunos autores consideran poco prácticos los derivados de Tricloroacético y de Trimetilsilicio (TMS), ya que los reactivos anhídrido tricloroacético y cloruro de trimetilsilicio son costosos y deben manejarse con precauciones especiales por su elevada reactividad con la humedad del aire; además, la formación del derivado, provoca un gran aumento en el peso molecular e introduce enlaces polares que disminuyen la volatilidad.

Para evitar cualquier pérdida por la humedad del aire, se prefiere una derivación directa en agua, seguida de una extracción selectiva con un solvente orgánico apropiado para cromatografía de gas, por ejemplo, los derivados N-permetilados, pueden extraerse fácilmente con una solución básica fuerte. Estos derivados presentan una separación clara de homólogos, tiempos de retención cortos y picos muy simétricos casi con cualquier fase estacionaria por lo que son muy apropiados para la cromatografía de gas (39).

Los derivados de Etil-oxicarbonilo y los de pentafluoropropionilo son estables si se conservan en solución de etil acetato sobre sulfato de sodio anhidro por tres semanas (18) y cuatro meses respectivamente (19). En cambio los derivados de N-isobutiloxicarbonilo son muy estables a la humedad y no requieren ninguna precaución para evitar su descomposición durante el manejo y almacenamiento (81).

El exceso de agente formador de derivados, se debe eliminar siempre con una corriente de nitrógeno.

4.1.2.2 ESTANDARES INTERNOS.

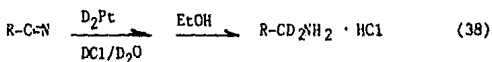
Por lo general, todos los métodos de cromatografía de gas, emplean estándar

res internos, ya que se requieren cantidades muy pequeñas de poliaminas, lo que agudiza problemas como adsorción al vidrio (particularmente la espermina) y otros materiales, así como la alteración por enzimas o bacterias (28).

El estándar debe ser un compuesto con propiedades físicas y químicas iguales a las del compuesto a analizar, lo que asegura la detección de las diferencias que puedan presentarse en la extracción, derivación y desarrollo cro-
matográfico.

Daves y col. así como Smith y col., coinciden en señalar que un isótopo aná-
logo marcado radioactivamente, es un estándar ideal, ya que su comportamien-
to es idéntico al del compuesto analizado, además de que pueden prepararse estándares para cada una de las poliaminas (38). Por otro lado, las bandas correspondientes a muestras muy pequeñas, se deterioran rápidamente; agre-
gando análogos deuterados, se eleva el nivel total de cada poliamina, aumen-
tándose la sensibilidad de la detección (28).

Se han preparado estándares deuterados de gran pureza isotópica por deutera-
ción catalítica, según la siguiente reacción:



También se usan como estándares internos poliaminas marcadas con ¹⁴C (32), 1-8 diamino-octano (18,31), hexanodiamina (19), D-anfetamina para PUT y CAD y benzoanfetamina para ESD y ESM (52). Ninguno de éstos a excepción de los análogos de ¹⁴C reaccionan en forma idéntica a las poliaminas, pero se separan bien de éstas (aparecen en el espectro en una región libre de interfe-
rencia) y poseen la funcionalidad del grupo amino (18).

4.1.2.3 CONDICIONES GENERALES PARA LA CROMATOGRAFIA DE GAS.

La cromatografía de gas requiere una concentración y purificación previa de la muestra, misma que en la mayoría de los casos se consigue por cromatografía de intercambio iónico. Si no se efectúa este paso, a menudo se observa una acumulación y depósito de sustancias extrañas en el punto de inyección, que con el uso continuo pueden degradar algunos de los compuestos derivados, además de propiciar la aparición de picos no identificados y de este modo, la cuantificación se hace casi imposible (19,31).

Las columnas empleadas en el análisis de poliaminas, se empacan con una gran variedad de soportes y fases líquidas, ya que su uso depende de la volatilidad de los derivados.

Los derivados con valores bajos de volatilidad como la EOC-espermina no se eluyen fácilmente de fases líquidas muy polares como SP-1000 y POLY-A 101A aún con temperaturas programadas. Por otro lado, si se emplean fases líquidas menos polares como SE-30 y OV-17, los derivados de EOC muestran una tendencia a producir picos en una forma poco definida, por lo que en este caso la solución consiste en usar una fase líquida que contiene 1.5% de SE-30 y 0.3% de SP-1000.

También se ha sugerido que una silanización del soporte, contribuye a la elución cuantitativa de la espermina al aumentar su adsorción a la columna (18).

La tabla 4.4 presenta los soportes y fases líquidas más empleados en el análisis de poliaminas por cromatografía de gas.

TABLA 4.4
SOPORTES Y FASES LIQUIDAS MAS EMPLEADAS EN EL ANALISIS
DE POLIAMINAS POR CG

DERIVADO	SOPORTE	FASE LIQUIDA	SENSIBILIDAD	REF
TFA	Gas QROM Q 100/120	OV-17 3%	1 pmol	38
TMS	Chromosorb WHP	OV-17 3%	1 pmol	28
TFA	Chromosorb W80/100	SE-30 3%	n.r.	14
TFA	Chromosorb S180/100	OV-17 8%	n.r.	89
PFP	Gas Chrom Q 100/120	OV-225 3%	1 pmol	19,32
PFP	Chromosorb WHP 80/100	OV-17 3%	n.r.	90
N-BOC	Gas Chrom P 80/100	SE-30 1.5%-SP 1000 0.3%	1 nmol	31
		SE-30 1%- SP 1000 0.5%	n.r.	31
EOC	Unipart HP S1	SE-30 1.5%-SP 1000 0.3%	12.5nmol	18
NFM	Chromosorb W 80/100	Verseamid 900 5%- KH 5%	n.r.	39
		OV-17 0.3%	n.r.	39
		Carbowax 20 M 10%	n.r.	39
		SE-52.5%	n.r.	39
Libres	VIDRIO 60/80	Carbowax 40%-20M KH 1%	n.r.	52

A pesar de que la cromatografía de las poliaminas como bases libres presenta muchas dificultades tales como una absorción muy fuerte a la columna, es casa volatilidad, presencia de colas, espectros dudosos, dificultad de transferencia a solventes orgánicos debida a una excesiva hidrofiliad, autores como Beninati y col. han reportado un método que emplea poliaminas sin derivar con una buena sensibilidad y con resultados reproducibles (52).

La temperatura es una variable muy importante en la cromatografía de gas. Normalmente se emplea un sistema de temperatura controlada y programada en un rango de 150° a 300°C para posibilitar el análisis simultáneo de las poliaminas a pesar de sus amplios rangos de volatilidad (32).

La tabla 4.5 presenta las temperaturas de elución de algunos derivados de pentafluoropropionilo en una fase líquida de OV-225(32).

TABLA 4.5

TEMPERATURAS DE ELUCION DE LOS DERIVADOS DE PFP DE LAS POLIAMINAS EN OV-225

COMPUESTO	TEMPERATURA (°C)
Putrescina	163
Cadaverina	168
1-6 Diaminohexano	172
1-8 Diaminooctano	183
Espermidina	214
Espermina	250

(32).

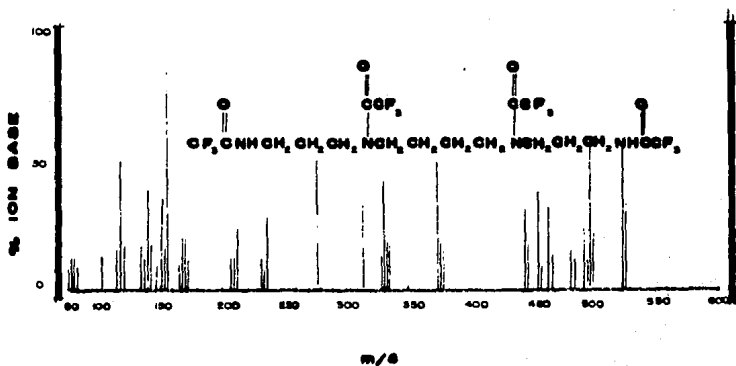
En cuanto al gas portador, el mas empleado es el Nitrógeno, en flujos que varían entre 30 ml/m y 80 ml/ m.

Cuando la detección se hace con espectrómetro de masas, el Nitrógeno, se sustituye por Helio con un flujo entre 30 ml/m y 50 ml/m (39,90).

La figura 4.6 muestra el espectro producido por impacto electrónico del derivado trifluoroacetilado de la espermina previamente separado en una columna empacada con OV-17 al 3% sobre Chromosorb W-HP con un gradiente de temperatura de 120°C a 300°C (29).

FIG. 4.6

ESPECTRO DE MASAS DE LA ESPERMINA



(29)

CAPITULO V . METODOS ENZIMATICOS.

5.1 GENERALIDADES.

Con el término análisis enzimático, se entiende el tipo de análisis efectuado con ayuda de enzimas. La mayor ventaja de las enzimas en este aspecto, es su capacidad para reaccionar específicamente con determinados componentes de una mezcla. Esto reduce considerablemente las separaciones laboriosas y por ende, el tiempo de análisis. Además, la cantidad de sustrato(muestra) requerido para el análisis es muy pequeña.

No obstante, el uso de enzimas tiene ciertas limitantes. La confiabilidad, depende de un control metuculoso de las condiciones de análisis. La presencia de contaminantes puede inhibir las reacciones catalizadas por enzimas, por lo que la pureza de la preparación es crucial. La inestabilidad de las enzimas puede limitar su uso, pero esto no ocurre si se emplean las condiciones apropiadas (91).

La concentración de una sustancia que reacciona con una enzima, generalmente se determina por los métodos de "punto final", que consisten en determinar el producto de una reacción enzimática formado estequiométricamente a partir del compuesto a analizar.

La determinación puede hacerse por análisis fisicoquímico o enzimático del producto o bien del sustrato residual después de que se ha completado la reacción enzimática (92).

En algunos casos la determinación es auxiliada por una reacción secundaria con algún colorante o compuesto que origine una reacción fácilmente cuantificable, esta reacción recibe el nombre de reacción indicadora (91).

Los procedimientos enzimáticos para la determinación de poliaminas, se basan principalmente en los productos de oxidación que se forman por la acción de enzimas sobre las poliaminas, que sirven como base para ensayos colorimétricos, fluorométricos o de luminiscencia.

5.2 OXIDACION ENZIMATICA DE POLIAMINAS.

La oxidación de poliaminas por diversas amino oxidasas, es un mecanismo de biodegradación de éstas y los productos de reacción difieren dependiendo de la enzima que actúe y de su procedencia.

Putrescina y Cadaverina son oxidadas por la amino oxidasa (E.C. 1.4.3.6.) a ácido- γ aminobutírico.

La amino oxidasa o espermina oxidasa, cataliza la formación de iminoaldehídos a partir de espermidina y espermina.

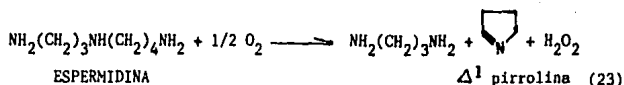
La espermidina oxidasa cataliza la formación de Δ^1 pirrolina.

La poliamina oxidasa, cataliza varias interconversiones de las poliaminas: la espermina, es convertida a espermidina y aminopropionaldehído (con formación de H_2O_2), mientras que la espermidina es convertida a putrescina y aminopropionaldehído (6).

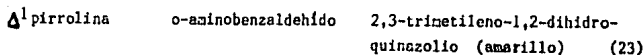
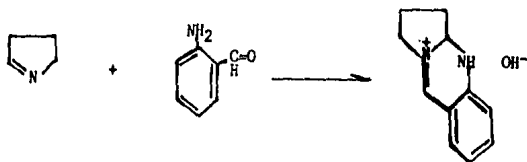
El primer método enzimático para determinar poliaminas basándose en sus productos de oxidación fue reportado por Bachrach en 1963 y se fundamenta en la formación de Δ^1 pirrolina por acción de espermidina oxidasa de Serratia marcescens sobre espermidina.

La oxidación enzimática de espermidina, procede de acuerdo con la siguiente

reacción:



La Δ^1 pirrolina formada, se determina coloriméticamente con o-aminobenzaldehído por medio de la siguiente reacción indicadora:

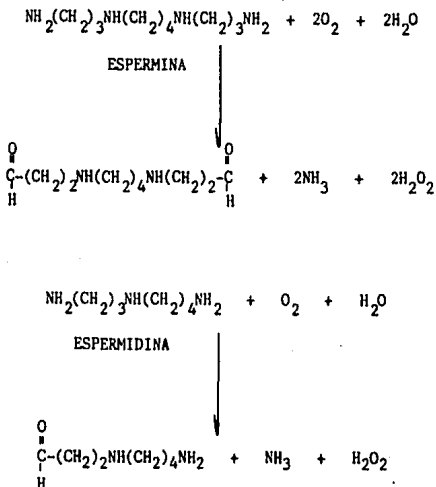


La desventaja de este método es que de todas las diaminas y poliaminas probadas, solo la espermidina produce un compuesto que reacciona suficientemente con o-aminobenzaldehído, además de que no es muy sensible (μ moles) (23).

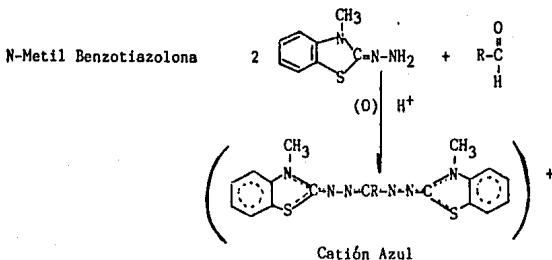
Otro método, se basa en la formación de iminoaldehídos por una amino oxidasa sérica o plásmica. Estos son analizados por reacción colorimétrica con hidrocloreuro de N-metil-2 benzotiazolona hidrazona.

El proceso se esquematiza en las siguientes reacciones:

Reacción I



Reacción II



Este método es bastante rápido, ya que no es necesario purificar la amino-oxidasa sérica, se puede emplear el suero de bovino directamente e incubar durante 4 h a 37°C. No obstante, si se recomienda purificar la muestra por

intercambio iónico para eliminar aldehídos que puedan interferir.

Por este método, se obtiene un valor combinado para ESD y ESM ya que se oxidan ambas. La sensibilidad de este método es de micromoles (24).

Matsumoto, purificó una diamino oxidasa de placenta humana que actúa exclusivamente sobre PUT y CAD y determinó el peróxido de hidrógeno formado fluorométricamente por medio de una reacción en la que se convierte ácido homovanillico a un compuesto altamente fluorescente en presencia de peróxido de hidrógeno. La sensibilidad alcanzada por este método es de 1nmol en muestras de orina (93).

5.3 CUANTIFICACION POR OXIDACION CON UNA AMINO OXIDASA DE FRIJOL DE SOYA.

Matsumoto en 1981, efectuó la cuantificación de poliaminas en orina mediante la oxidación con una amino oxidasa de frijol de soya. Esta amino oxidasa es activa sobre PUT, CAD, ESD y ESM y presenta elevadas actividades y valores muy bajos de Km para cada amina.

La oxidación produce peróxido de hidrógeno, que se cuantifica espectrofotométricamente a 505 nm por reacción de 4 aminoantipirina con fenol, en presencia de peróxido.

Todas las poliaminas, generan 1 mol de H_2O_2 a excepción de la espermina, que genera 2 moles. Debido a lo anterior, la cantidad de diaminas y poliaminas obtenida es solo una aproximación. La sensibilidad de este método es de 10 nmoles.

La amino oxidasa de frijol de soya, es la única enzima que puede determinar simultáneamente diaminas y poliaminas, ya que varias amino oxidasas son activas sobre diaminas pero no sobre poliaminas, tal es el caso de las amino oxidasas de riñón de cerdo y de placenta humana. Por otro lado, las amino oxidasas de suero de buey, cebada, chícharo y avena, permiten determinar poliaminas pero no permiten la determinación de diaminas (94).

Fagerstrom en 1984, empleó la misma amino oxidasa de frijol de soya en la cuantificación de poliaminas, pero cuantificó el peróxido de hidrógeno producido haciéndolo reaccionar con luminol. Este método alcanza una sensibilidad de 5 pmoles (47).

5.3.1 PREPARACION DE LA ENZIMA DE FRIJOL DE SOYA.

El frijol de soya, se deja germinar sobre heno húmedo a 20°C durante 6 ó 7 días en la obscuridad, después de lo cual, se lava con agua, se homogeniza y se filtra; el fluido restante, se satura al 45% con sulfato de amonio y se centrifuga.

El precipitado se disuelve en 7 volúmenes de amortiguador de fosfatos 0.1M (pH 7.8) y se dializa contra 50 volúmenes de la misma solución amortiguadora. Se centrifuga para eliminar el precipitado inactivo.

El sobrenadante, se usa para el análisis con una actividad de 1.5 a 2 $\mu\text{mol}/60\text{ m} / 0.05\text{ ml con } 1\text{ ml}$ de putrescina como sustrato.

Para hacer la preparación mas estable, se puede liofilizar consiguiendo de esta forma una conservación de 2 meses a -20°C o bien, puede conservarse como precipitado de sulfato de amonio a 4°C (94).

5.3.2 DETERMINACION DE DIAMINAS Y POLIAMINAS EN MUESTRAS DE ORINA.

Una alícuota de 12.5 ml de orina y 2.5 ml de HCl concentrado, se colocan en un tubo y se calientan a 100°C por 6 h en baño de aceite para hidrolizar las poliaminas conjugadas.

Se afora el volúmen a 15 ml con agua destilada y se centrifuga a 1 500 X g durante 10 m.

Se toman 12 ml del sobrenadante y se ajustan a pH 5-7 con NaOH 5N y se afora a 50 ml con agua destilada. Esta solución, se aplica a una columna de Amberlite CG-50 empacada en una jeringa desechable de 3 ml.

La columna se lava con 15 ml de agua destilada y con 3 ml de HCl 0.5N.

Las aminas se eluyen con 10 ml de HCl 0.5N.

Se toma 1 ml de la solución eluida como alícuota para el ensayo.

La mezcla de reacción que es de 1,65 ml, consiste en:

- 0.6 ml de amortiguador TRIS 1.0M
- 0.05 ml de amino oxidasa de soya
- 0.05 ml de 4-aminoantipirina (4 mg/ml)
- 0.05 ml de fenol (0.5 ml v/v)
- 1 ml de solución de diaminas o poliaminas en 0.25 N HCL (pH 8)

Se incuba la mezcla durante una hora a 37°C y el color rojo desarrollado se determina en un espectrofotómetro a 505 nm.

El cálculo, se hace como sigue:

$$\mu \text{ Mboles de diaminas y poliaminas} = \frac{0.1 (D.O.m - D.O.bm) \cdot X \text{ 24h vol/ml}}{\text{totalcs en 24 horas} \quad D.O.e - D.O. be}$$

- Donde:
- D.O. m Es la densidad óptica de la muestra.
 - D.O. bm Es la densidad óptica del blanco de la muestra, que difiere de la muestra en que 0.05 ml de agua se adicionan a la mezcla de incubación en lugar de la solución de fenol.
 - D.O. e Es la densidad óptica del estándar externo, que consiste en 100 μ mol de PUT adicionada a la mezcla en lugar de la muestra.
 - D.O. be Es la densidad óptica del blanco del estándar, determinado adicionando 1 ml de agua destilada en lugar de la solución de PUT (94).

En la figura 5.1 se presentan las curvas estándar para diaminas y poliaminas.

En la figura 5.2, se muestran las cantidades de diaminas y poliaminas encontradas después de una intervención quirúrgica en pacientes con cáncer de estómago. Se observa claramente una tendencia a disminuir después de la cirugía. Este ejemplo muestra la utilidad de este ensayo como un marcador bioquímico de la actividad del cáncer.

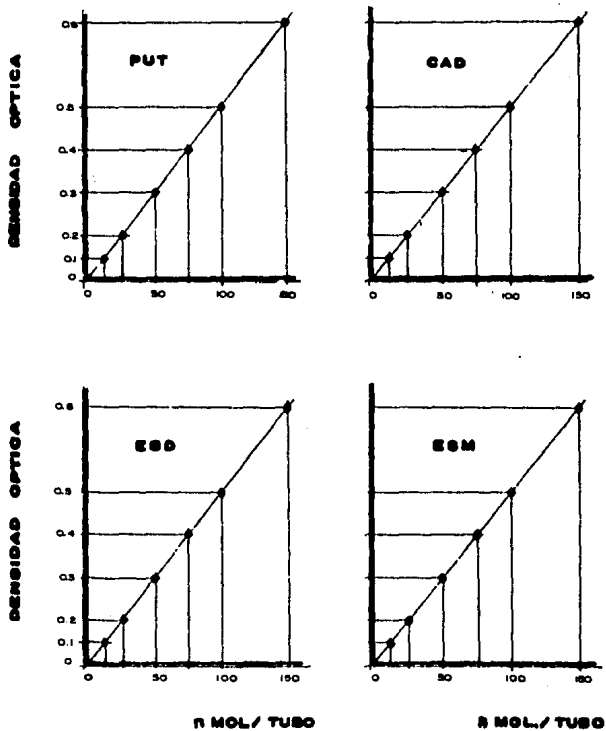
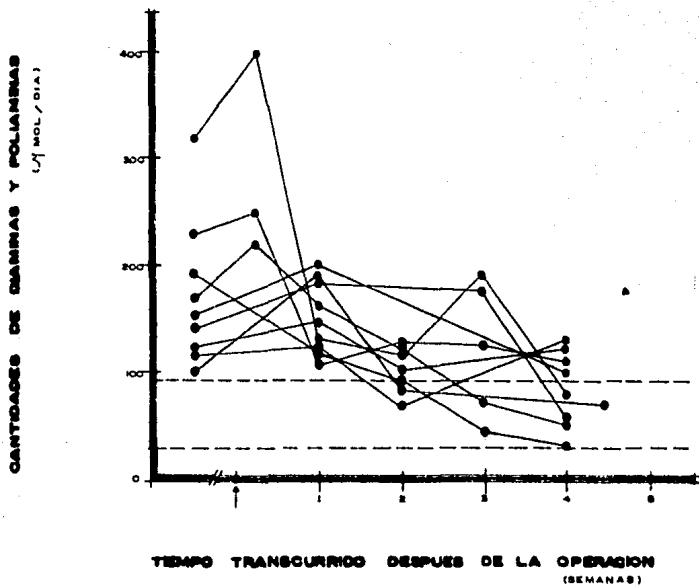


Fig. 5.1 CURVAS ESTANDAR PARA DIAMINAS Y POLIAMINAS (94).

FIGURA 5.2



La línea punteada representa una Desviación Estándar de 2 mayor y menor al valor normal.
La flecha indica la operación.

5.4 METODOS ENZIMATICOS QUE EMPLEAN REACCIONES CONJUGADAS.

Kubota y col., desarrollaron un ensayo enzimático simple para determinar poliaminas urinarias, mediante dos reacciones enzimáticas.

En la primera reacción, se hidrolizan las poliaminas conjugadas con la enzima acilpoliamina amidohidrolasa; de este modo se evita el proceso de hidrólisis tan largo que requieren las muestras de orina.

En la segunda reacción, se adiciona otra enzima, una putrescina oxidasa específica para PUT, ESD y CAD, que forma peróxido de hidrógeno cuantificable espectrofotométricamente a 514 nm (95).

La acilpoliamina amidohidrolasa, se obtiene de Streptomyces avellaneus R-20 mientras que la putrescina oxidasa, se extrae de Micrococcus rubens.

Este método es simple, rápido y aplicable al análisis de rutina ya que se pueden realizar hasta 100 determinaciones en 3 h y es tan sensible como la cromatografía líquida de alta presión (fig. 5.3).

La única desventaja de este método, es que no determina los niveles individuales de poliaminas, sino el total de PUT, CAD y ESD. No obstante, se detecta cualquier elevación de poliaminas totales en orina.

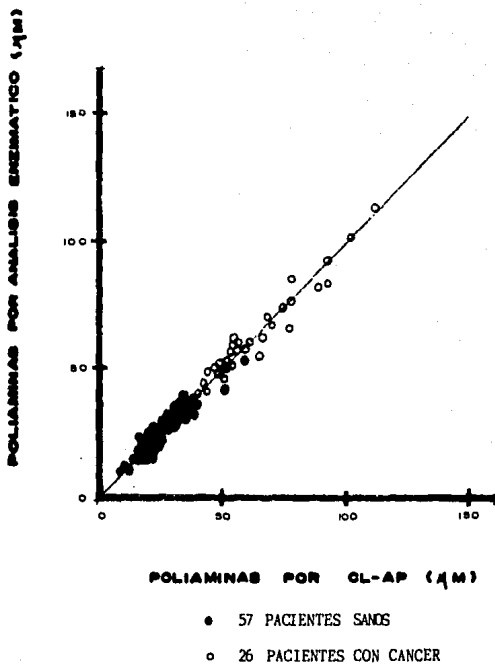


FIGURA 5.3 CORRELACION ENTRE LA DETERMINACION POR PUTRESCINA OXIDADA Y POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (95).

CAPITULO VI. METODOS INMUNOLOGICOS.

Los primeros estudios inmunológicos de poliaminas, se efectuaron en 1960 por Quash y Wilson en la búsqueda de técnicas sensibles y específicas que emplearan volúmenes pequeños de muestra y pudieran efectuarse directamente sobre material biológico. Estos investigadores, unieron espermina a lisozi-
ma por reacción de diazotización y emplearon este complejo, al que llamaron "lisozi-
ma esperminada" para inmunizar ciertos animales. El antisuero así formado fue destinado a estudios de tejidos tisulares o para efectuar deter-
minaciones inmunoeléctroforéticas de poliaminas en suero humano, no obstan-
te, la reactividad cruzada del antisuero con varias poliaminas hace difícil obtener medidas analíticas precisas (34).

Se han utilizado esferas de látex a fin de secuestrar poliaminas y compro-
bar su existencia en diferentes sitios celulares (35) o para inmovilizar anticuerpos antipoli-
amínicos por aglutinación en presencia de poliaminas y posibilitan la cuantificación de éstas (48,96).

La tecnología analítica de poliaminas, se ha visto muy reforzada por la pro-
ducción de anticuerpos y su determinación por métodos nefelométricos.

Los métodos nefelométricos constituyen una alternativa muy valiosa en paí-
ses en desarrollo en donde la inversión en equipo de centelleo e isótopos de poliaminas, sería prácticamente imposible (97).

6.1 ACARREADORES MOLECULARES.

Para lograr que moléculas tan pequeñas como las poliaminas provoquen una rea

puesta inmune, es necesario que éstas formen parte de una molécula compleja mas grande. Para esto, se han empleado diversas proteínas, principalmente seroalbúmina bovina (SAB), ovoalbúmina, tiroglobulina (Tg), hemocianina o algunos polímeros de aminoácidos como el ácido poli-L-glutámico (PLG) o poli-L-lisina (PLL).

Las poliaminas poseen grupos amino primarios que pueden conjugarse mediante una reacción carbodiimida con los grupos carboxilo del acarreador.

Debido a la alta solubilidad de las poliaminas en agua, la reacción de conjugación se efectúa por lo general en medio acuoso.

El hapteno es la parte de la molécula antigénica que confiere especificidad a ésta. La relación hapteno/acarreador altera la potencia del antígeno y puede modificarse cambiando la concentración de los compuestos reactivos, el pH del medio, el tiempo de reacción y la temperatura.

Los acarreadores moleculares difieren en peso molecular y en el número de grupos carboxilo disponibles para reaccionar con los grupos amino de las poliaminas (tabla 6.1).

TABLA 6.1
ACARREADORES MOLECULARES

PROPIEDAD	SAB	PLL	Tg
PESO MOLECULAR	69 000	190 000	650 000
COOH LIBRES (aprox.)	104	720	1 020

6.2 FORMACION DE ANTICUERPOS.

En 1960, Bartos reportó la existencia de anticuerpos antipoliámínicos naturales en el suero de conejo (98) y Ripoll desarrolló un método nefelométrico para cuantificar estos anticuerpos en suero humano por medio de la aglutinación producida al incubar muestras de suero con partículas de látex que poseen PUT enlazada covalentemente a su superficie. Los compuestos encontrados por Bartos han sido clasificados como IgG por su migración electroforética en gel de poliacrilamida (99.).

No obstante la existencia de anticuerpos naturales, los métodos analíticos requieren de la preparación de una mayor cantidad de anticuerpos, por lo que se ha recurrido a la inmunización de animales con complejos de políamína-acarreador como antígenos.

El resultado de la inmunización depende de varios aspectos tales como el tipo de animal empleado, la ruta de inmunización y la dosis del antígeno. Se eligen preferentemente animales no rumiantes para la obtención de los anticuerpos debido a que el suero de los rumiantes tiene un alto contenido de diamino oxidasa.

Existen dos técnicas de inmunización: la técnica de inyección en sitios múltiples y el procedimiento de cosecha de macrófagos.

El método de inyección múltiple consiste en mezclar 1 ml de antígeno (1 mg/ml de solución salina) y 1 ml de adyuvante de Freund completo, procurando obtener una emulsión estable; la mezcla se inyecta en varios sitios alrededor

del cuello. Una semana después, se prepara una mezcla similar a la anterior pero usando adyuvante de Freund incompleto y se administra a intervalos bi-semanales.

La técnica de cosecha macromolecular, se realiza disolviendo de 200 a 300 μ g de conjugado en 1 ml de solución salina y se inocula en la región peritoneal del conejo. Dos horas después, se introducen 150 ml de solución salina estéril en la cavidad peritoneal y el lavado es drenado 20 m después por cateterización. Con este procedimiento, se recupera mas del 80% de la solución salina inyectada. El lavado se centrifuga bajo refrigeración y la fracción celular se resuspende en 2 ml de solución salina; la mitad se inocula por vía intravenosa y la segunda se emulsifica con adyuvante de Freund completo y se aplica por vía intravenosa múltiple como en el caso de inyección múltiple.

Comenzando la segunda semana después de la inmunización inicial, los animales se sangran a través de la vena marginal de la oreja.

La fig. 6.1 muestra los resultados obtenidos por inmunización mediante inyección múltiple comparados con la técnica de cosecha de macrófagos.

El tiempo que se requiere para formar un anticuerpo de calidad recibiendo inyecciones múltiples es de 9 meses, mientras que el inicio de la respuesta inmune por cosecha de macrófagos, acorta el tiempo a 4 meses (34).

La mayoría de los métodos inmunológicos para cuantificar poliaminas emplean suero antiespermínico.

ESTA TESTS NO DEBE
SER DE LA B...

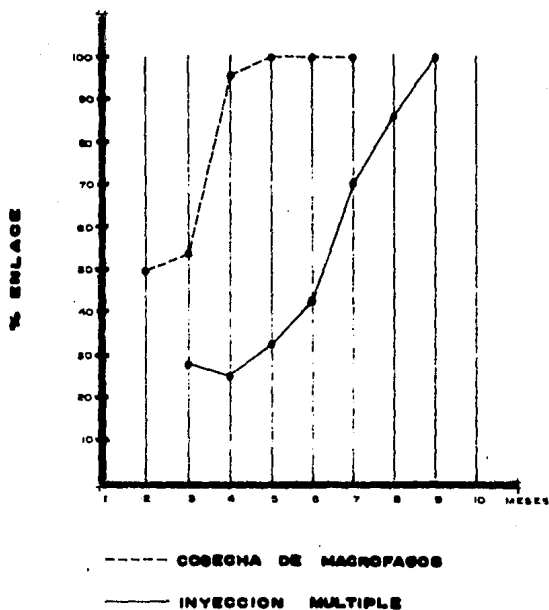


FIG. 6.1 TIEMPO NECESARIO PARA FORMAR ANTICUERPOS POR LOS
LOS METODOS DE INMUNIZACION (34).

6.3 PURIFICACION DE ANTICUERPOS.

En general, la purificación de anticuerpos, procede en dos etapas: una inespecífica que permite obtener inmunoglobulinas purificadas y una específica que permite la separación del anticuerpo de las inmunoglobulinas restantes (100).

La primera etapa consiste en una precipitación salina con sulfato de amonio al 33% (35). El precipitado de proteína es separado por centrifugación durante 30 m a 5 000 rpm y disuelto en agua hasta un volumen igual a la mitad del inicial. Se adiciona un volumen de solución de sulfato de amonio y se precipita. El procedimiento anterior se repite cuatro o cinco veces.

El precipitado obtenido después de la última precipitación se dializa contra NaCl 0.15 M o la solución amortiguadora deseada, hasta eliminar completamente el sulfato de amonio. La dialisis puede sustituirse por filtración a través de Sephadex G-25 ó 50 equilibrado previamente con el mismo amortiguador (100).

La segunda etapa puede realizarse mediante la precipitación del anticuerpo por adición de antígeno en cantidad equivalente y una disociación del complejo antígeno-anticuerpo con dinitrofenol 0.1 M en NaCl 0.15 N y amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 8. Se centrifuga, y el sobrenadante se filtra en una columna con Sephadex G-200 estabilizada en el mismo amortiguador. En la solución eluida aparecen tres picos, el primero corresponde a complejos solubles Ag-Ac, el segundo al anticuerpo puro y el tercero al antígeno (100).

6.4 DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTISUERO.

La especificidad del antisuero antiespermínico, se determina respecto a pu trescina, espermidina y compuestos de estructura similar.

El porcentaje de reactividad cruzada con otras poliaminas, se determina por la inhibición ocasionada al incubar el antisuero antiespermínico en presen cia de cantidades crecientes de los compuestos interferentes.

La cuantificación de la inhibición, varía de acuerdo a la metodología segu ida. El método inmunoenzimático descrito por Fujiwara en 1983 determina la es pecificidad del antisuero, midiendo el desplazamiento de la espermina del conjugado ESM-Galactosidasa³ por putrescina, espermidina y otros compues- tos, resultando en un 88% de reacción cruzada con espermidina, 0.13% con pu trescina, un 0.08% con diamino propano y un 0.04% con cadaverina, en térmi- nos de la cantidad del compuesto requerida para inhibir el enlace de esper mina en un 50% (101).

El radioinmunoensayo reportado por Bartos en 1975, relaciona el porcentaje de ³H espermina enlazada al anticuerpo con la concentración de diferentes poliaminas libres. La cantidad de cada compuesto competitivo que correspon- de a un desplazamiento del 50% de ³H espermina, se determina con la siguien te fórmula:

$$\% \text{ de reacción cruzada} = \frac{\text{pg espermina enlazados al 50\%}}{\text{pg del compuesto enlazados al 50\%}} \times 100$$

Los resultados de especificidad del antisuero antiespermina de conejo, se muestran en la tabla 6.2.

TABLA 6.2

PORCENTAJE DE REACTIVIDAD CRUZADA DE POLIAMINAS Y COMPUESTOS
SIMILARES CON ANTISUERO ANTIESPERMINICO DE CONEJO Y DE CABALLO

COMPUESTO	% ANTISUERO CONEJO (Dil. 1/900)	% ANTISUERO CABALLO (Dil. 1/500)
Espermina	100	100
Espermidina	22.2	21.4
Putrescina	1.0	0.006
Cadaverina	0.16	0.03
Diaminopropano	5.9	0.12
Histamina	0	0
Ornitina	0	0
L-Lisina	0	0

(49)

El porcentaje mas bajo de reactividad cruzada entre anticuerpos, se ha encontrado en los anticuerpos naturales de conejo por Bartos (98). Esto sugiere, que la disponibilidad de anticuerpos antiesperminicos naturales de alta especificidad y afinidad en el suero normal del conejo podría mejorar considerablemente la sensibilidad de los métodos inmunoquímicos para la cuantificación de poliaminas (98).

El método de aglutinación con esferas de látex requiere la determinación de la especificidad de las esferas de látex conjugadas. Por ejemplo, la especificidad de esferas de látex-Putrescina, se encuentra incubándolas con an

tisuerdo y diferentes concentraciones de PLG-ESM, PLG-ESD y PLG-PUT durante 30 m a 37°C (v/v 1:1).

Una reacción negativa, se manifestará como una inhibición en la aglutinación en la que las esferas de látex-PUT se mantienen dispersas, mientras que en ausencia de otras poliaminas, se efectúa su aglutinación en presencia del antisuero (reacción positiva) (48).

6.5 PROCEDIMIENTOS INMUNOLOGICOS QUE EMPLEAN ESFERAS DE LATEX.

6.5.1 POR VISUALIZACION DIRECTA.

Diversas sustancias se han empleado para la fijación de antígenos. Figuran entre ellas las partículas de bentonita, las partículas de colodión y las de látex (poliestireno). De todas ellas, la mas usada es el látex de poli-estireno de 0.21 a 0.81 μ de diámetro, que suspendido al 1% en solución salina de borato a pH 8.2 (partes iguales de NaCl 0.3M y ácido bórico 0.1 M ajustado a pH 8.2 con NaOH), glicina 0.1 M ajustada a pH 8.2 con NaOH 0.1 N u otras soluciones estabilizadoras, puede fijar antígenos en su superficie por simple contacto, a temperaturas y tiempos variables. Se consiguen buenas fijaciones entre los 35° y 50°C y los tiempos varían con la temperatura empleada (100).

Cuando se mezclan volúmenes iguales (aproximadamente 0.5 ml) de esferas de látex que contienen anticuerpos antipoliámínicos unidos covalentemente con poliaminas séricas, se observa una aglutinación específica que se observa en el fondo del tubo como un sedimento.

Usando diferentes diluciones del suero, el método puede hacerse cuantitativo.

Las esferas de látex contienen grupos carboxilo reactivos que permiten la inmovilización de los anticuerpos si se desea determinar poliaminas, o bien, la inmovilización de haptenos poliamínicos si se pretende determinar anticuerpos antipoliaminas.

En un principio, las esferas de látex solo se empleaban para visualizar poliaminas y eventualmente para cuantificar sitios antigénicos celulares en la membrana (35).

La fig. 6.2 muestra el resultado obtenido al incubar células de embrión de pollo con esferas de látex que contienen anticuerpos antipoliamínicos totales (anti-ESM, anti-ESD y anti-PUT) como se observa al microscopio electrónico. Se pueden observar las esferas de látex adherirse a la superficie celular en forma de pequeños grumos alrededor de la célula (96).

La fig. 6.3 muestra que si las esferas antipoliamínicas se preabsorben con putrescina, se elimina completamente su fijación a la superficie celular así como alrededor de la célula (96).

Esto sugiere, que las esferas alrededor de las células, son indicadoras de una interacción de los anticuerpos antipoliamínicos con las poliaminas celulares. Aquellas que se adhieren a la membrana, proporcionan evidencia de que las células de embrión de pollo, tienen sitios antigénicos poliamínicos en la membrana, pero no permiten la cuantificación de estos sitios (35).

Para conseguir una determinación cuantitativa, es necesario controlar el ta

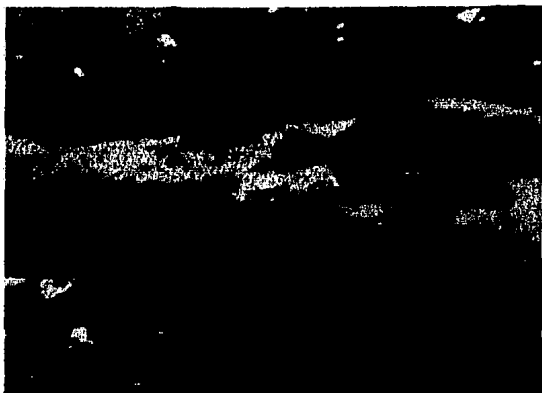


Fig. 6.2. CELULAS DE EMBRION DE POLLO INCUBADAS CON ESFERAS DE LATEX ENLAZADAS A ANTICUERPOS ANTIPOLIAMINAS, X 7 000 (96).



Fig. 6.3. CELULAS DE EMBRION DE POLLO. INCUBADAS CON ESFERAS DE LATEX ENLAZADAS A ANTICUERPOS ANTIPOLIAMINAS PREABSORBIDAS CON PUTRESCINA. X 6 000 (96)..

maño de las esferas, el tipo y fase del ciclo celular y el número de anticuerpos enlazados a la esfera (96).

Bonnefoy-Roch y col., realizaron una prueba de precipitación directa con anticuerpos antipoliáminas enlazados a esferas de látex incubados con concentraciones decrecientes de un complejo PLG-ESM y con varias diluciones de suero normal y de pacientes con alguna enfermedad maligna.

La comparación de los resultados obtenidos se observa en la tabla 6.3.

TABLA 6.3
AGLUTINACION DIRECTA DE POLIAMINAS EN SUERO HUMANO

Reacción a diferentes concentraciones							
TIPO DE SUERO	DILUCION						Control
	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	
NORMAL	D	D	D	D	D	D	D
PACIENTE	A	A	A	A	A	D	D

A. REACCION POSITIVA . D. REACCION NEGATIVA. (48)

Se observa que a diluciones menores a 1:960 en el suero de pacientes aparece aglutinación, mientras que en todas las diluciones de suero normal, las esferas permanecen dispersas (48).

Este técnica es bastante simple, pero requiere una cantidad muy grande de esferas de látex enlazadas con anticuerpos para poder visualizar la agluti-

ación.

6.5.2 METODOS NEFELOMETRICOS.

Los métodos nefelométricos para cuantificar el sedimento, ofrecen una alternativa mas precisa, además de que requieren diez veces menos partículas de látex que los métodos de visualización directa.

Los procedimientos nefelométricos, se basan en la determinación de la luz dispersa al pasar a través de un medio con partículas dispersas con un índice de refracción diferente al del medio, a un ángulo recto con respecto al haz de luz incidente. A medida que el tamaño de la partícula aumenta, habrá mas radiación que se disperse hacia adelante (88).

Como método de rutina, la nefelometría tiene muchas limitaciones, porque deben tomarse muchas precauciones para asegurar que el ambiente y el material están libres de polvo que pueda interferir en la determinación (se debe lavar el material con agua destilada y filtrar todas las soluciones).

El procedimiento nefelométrico mas empleado, utiliza esferas de látex a una concentración de 2µg de látex por ml, mezcladas con PLG-poliaminas a diferentes concentraciones y determina la luz difundida a 90° en un espectrofotómetro a 560 nm.

Debido a que los anticuerpos están inmovilizados, debe asegurarse que la determinación se haga una vez que la reacción Ag-Ac se haya completado.

Se elige un tiempo de incubación de por lo menos 45 h que es cuando se alcanza el máximo en la intensidad de luz difundida.

La intensidad de la luz difundida, es proporcional a la concentración de antígeno adicionado.

6.6 RADIOINMUNOANÁLISIS.

La cuantificación de pequeñas cantidades de antígenos no detectables por los métodos convencionales, puede lograrse si estos antígenos se marcan con isótopos radioactivos. El empleo de estos últimos, permitió el desarrollo del radioinmunoanálisis, método sensible y específico que tiende a ser utilizado cada vez mas.

El radioinmunoanálisis se fundamenta en el hecho de que si a una serie de tubos que contienen una mezcla de antígeno radiactivo y anticuerpo en cantidad suficiente para saturar el 70% de los sitios de combinación, se les adicionan cantidades crecientes de antígeno sin marca, habrá competencia por la ocupación de estos sitios, y por lo tanto, se producirá una caída secuencial del antígeno marcado combinado a lo largo de la serie.

Con los datos obtenidos, se grafica en una escala logarítmica el antígeno sin marca añadido contra el antígeno marcado combinado. Dentro de un cierto rango, la curva regresiva es lineal, lo que hace posible la interpolación de los resultados obtenidos en un ensayo similar con un antígeno sin marca y de concentración desconocida (100).

El uso de métodos inmunológicos con poliaminas radiactivas fue descrito por Bartos en 1975 (49).

El principal atractivo que ofrece este método reside en el tamaño de muestra tan pequeño que se requiere, el uso directo del suero nativo sin necesidad de hidrólisis ni purificación, la sensibilidad pico y femtomolar así como el número tan grande de muestras que pueden analizarse (de 300 a 600 por semana) (97).

Para la inmunización, el radioinmunoensayo emplea un conjugado de ESM-Tg cuya relación molar de hapteno/acarreador se determina agregando el trazador de ^3H -espermina al inicio de la mezcla de reacción. Este autor encontró una relación de 131/1 para el conjugado ESM-Tg.

Los anticuerpos antiespermina, se obtienen inmunizando conejos con 1mg de conjugado disuelto en 1ml de NaCl 0.9% emulsificando con adyuvante de Freund completo y realizando la inmunización por inyección múltiple a intervalos bisemanales o por cosecha de macrófagos con 300 μg de conjugado por animal como inmunización peritoneal inicial.

Tanto el anticuerpo como las soluciones estándar de ^3H espermina, se diluyen en amortiguador de borato. El antisuero, se usa a una dilución que fije del 40 al 50% de la espermina marcada adicionada en los tubos de control que no contienen poliaminas sin marcar. La dilución final es de 2400 dpm/tubo de muestra.

El volumen total de reacción es de 1 ml y contiene 0.1 ml de ^3H espermina (2400 dpm), 0.1 ml de antisuero diluido y de 0.01 a 0.02 ml de muestra sérica.

La curva de calibración se prepara con el mismo amortiguador de borato y con espermina no marcada en una concentración de 100 a 5 000 pg y de 0.01 a 0.02 ml de solución proteica.

Después de incubar durante 2 h a 4°C, se separa la espermina enlazada de la libre, por adición de 0.1 ml de carbón activado/dextrana, seguida de centrifugación en frío a 1000 X g durante 20 m.

Después de centrifugar, se toma una alícuota de 0.8 ml del sobrenadante y se pipetea 10 ml de líquido de centelleo en viales de polietileno y se someten a conteo.

Junto con las muestras, se corren en paralelo tubos para determinar la fijación inespecífica (sin anticuerpos).

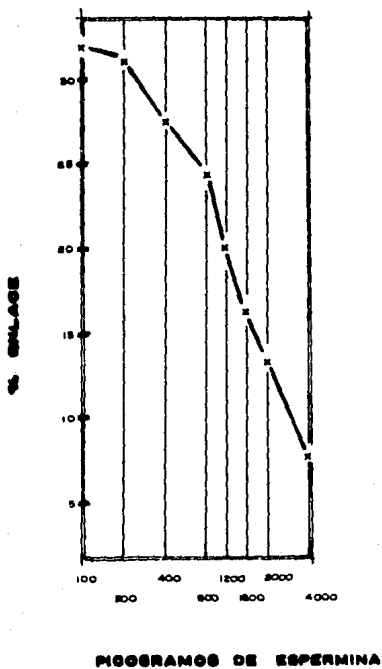
Todas las muestras se hacen por triplicado. La resta del valor de la fijación inespecífica del valor obtenido de la curva estándar y de los valores de las muestras individuales, mejora considerablemente la precisión.

Los valores de poliaminas en muestras desconocidas, se leen de la curva estándar que se construye graficando el porcentaje de ³H espermina fijada contra la concentración correspondiente de espermina no marcada en escala semi-logarítmica (Fig.6.4).

El valor de poliaminas totales libres en la muestra, principalmente de ESM y ESD, se expresa como ng de ESM equivalentes a 1 ml de suero.

Se pueden realizar medidas tan pequeñas como 200 ng de espermina/muestra, equivalentes a 1 ml de suero (49).

FIGURA 6.4 CURVA ESTANDAR PARA ESPERMINA (49)



CAPITULO VII. MÉTODOS PARA DETERMINAR POLIAMINAS EN DIVERSOS MATERIALES BIOLÓGICOS.

7.1 ORINA.

La tabla 7.1 agrupa los principales métodos para determinar poliaminas en orina con sus principales características. De acuerdo con las necesidades y recursos particulares, algunos pueden resultar mas ventajosos que otros. A continuación, se describirán dos de los mas utilizados.

7.1.1 Cuantificación de poliaminas en orina por cromatografía en capa fina de sus derivados dansilados.

La cromatografía en capa fina tiene la ventaja de ser un método sumamente accesible , además de que ofrece la oportunidad de trabajar con varias muestras de manera simultánea y de determinar todas las poliaminas y sus formas conjugadas con gran sensibilidad.

MATERIAL Y REACTIVOS.

- Placas de sílica gel 60 (250;µm)
- Tubos de ensayo
- Centrífuga
- Purificador de ultrasonido
- Espectrofotofluorómetro Aminco Bowman (J4P950)

- HCl concentrado (1 ml)
- Na₂CO₃ (2 ml)
- Cloruro de dansilo (30 mg)

TABLA 7.1
PRINCIPALES METODOS PARA LA DETERMINACION DE POLIAMINAS EN ORINA

METODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	ECONOMIA	MUESTRA	PREPARACION	DERIVADO	REF.
CG	1 pmol	di y poliaminas	**	25ml	Hidrólisis y purificación.	PPP	32
CG	1 nmol	di y poliaminas	**	4 µl	Hidrólisis y purificación por CL-IC	iso-BOC	31
CL-IC	1 nmol	di y poliaminas	***	n.r.	pp con Ac. TGA. Hidrólisis y filtración	---	37
CL (rev.)	76 fmol	di y poliaminas	***	20 µl	Hidrólisis	denzilo	36
CL-IC	10 pmol	di y poliaminas	*	n.r.	Hidrólisis	---	72
CL-IC	7.4 pmol	di y poliaminas	*	1 ml	pp con Ac. sulfonilciclístico e hidrólisis con H_2 (OH_2)	---	57
CCF	25 pmol	PUT, ESD y ESM	***	500 pmol	Hidrólisis	denzilo	12
CCF	7.4 pmol	di y poliaminas	***	1 ml	Reacción de NH_4 e hidrólisis	denzilo	53
CCF	0.01 pmol	di y poliaminas	***	n.r.	Hidrólisis y purificación por CL-IC	denzilo	25
CL-AP	0.01 nmol	di y poliaminas	**	0.5 ml	Hidrólisis y purificación por CL-IC	fluorocromina	41
CL-AP	n.r.	PUT, ESD y ESM	**	3 ml	Hidrólisis y purificación por CL-IC	tosilo	9
CL-AP	20 pmol	di y poliaminas	**	2 ml	Reacción de NH_4 e hidrólisis	denzilo	84
CL-AP (fase ligada)	0.01 nmol	di y poliaminas	**	6 ml	Purificación en SiH_4 ca Gel Sep Pak	denzilo	61
CCF-AP	n.r.	di y poliaminas	**	3 ml	Hidrólisis y extracción con hexano	denzilo	86
ENZIMATICO (amino oxidasa de soya)	1 pmol	di y poliaminas	***	1 ml	Hidrólisis y purificación por CL-IC	---	94
ENZIMATICO (dióxido oxidasa plasmática)	1 pmol	di y poliaminas	***	12.5 ml	Hidrólisis y purificación por CL-IC	---	93
ENZIMATICO (poliamino oxidasa en fungus)	1 pmol	ESD y ESM	***	n.r.	Hidrólisis	---	108

* Poco accesible

** Accesible

*** Muy accesible

- Acetona (1 ml)
- Prolina (250 mg)
- Tolueno (500 μ l)
- Cloroformo-Trietilamina (5:1)
- Trietanolamina-Propanol 2 (1:4)

PROCEDIMIENTO.

- Alícuotas de 10 ml de orina se centrifugan a 1000 X g durante 10 m a 2°C pa
ra separar cualquier tipo de células presentes.

- Se almacena a -25°C .

HIDROLISIS:

- Se toma 1ml de muestra y se hidroliza con un volúmen igual de HCl concen
trado (12 M) en un tubo sellado a 110°C durante 14 ó 16 h.

- Después de la hidrólisis, la muestra se neutraliza con Na_2CO_3 y se centri
fuga a 2000 X g durante 5 m.

FORMACION DE DERIVADOS:

- Se toman 200 μ l del sobrenadante y se les adicióna cloruro de dansilo
(30 mg/ml de acetona).

- Se añaden 100 μ l de solución saturada de Na_2CO_3 y la mezcla es purificada
en un purificador ultrasónico durante 2 ó 3 h.

- El exceso de cloruro de dansilo se convierte en dansil-prolina mediante
la reacción con 100 μ l de una solución de prolina (250 mg de prolina/ml).

- Las sulfonamidas se extaren con 500 μ l de tolueno y las capas son separa
das por centrifugación .

SEPARACION CROMATOGRAFICA.

- Se aplican alícuotas de 5 a 20 μ l de los extractos de tolueno a placas de sílica gel previamente activadas (110°C durante 1 h.
- La muestra se aplica con un micropipeta de 25 μ l.
- También se aplican concentraciones conocidas de estándares de las poliaminas dansiladas.
- La placa se coloca en una cámara de cromatografía ascendente con cloroformo-trietilamina (5:1) como solvente.
- Después de 1 h, la placa se rocía con 20 ml de una solución de trietanolamina-2 propanol (1:4) y se seca bajo vacío durante 16 h a temperatura ambiente dentro de un desecador que contiene sílica gel.
- Para evitar la disminución en la fluorescencia por absorción de agua durante el conteo, se deja reposar la placa durante 30 m a temperatura ambiente.
- La placa se analiza por fluorometría. El máximo de excitación es a 340 nm y el máximo de emisión a 505 nm (12).

Este método permite analizar poliaminas urinarias cuantitativamente sin concentración previa de orina y sin necesidad de eliminar el amoníaco. La preparación de la muestra es mínima, y el análisis rápido, reproducible y muy sensible.

La recuperación de poliaminas adicionadas a la orina es de 98% para PUT, 95% para PSD y 89% para ESM.

7.1.2 Cuantificación de poliaminas en orina por Cromatografía Líquida de Alta Presión.

La cromatografía líquida de alta presión es mas sensible que la cromatografía en capa fina y mucho mas rápida.

Su desventaja es la preparación de la muestra, debido a que es necesario purificar los derivados de dansilo obtenidos de fluidos fisiológicos mediante una separación por cromatografía en capa fina antes de la cromatografía de alta presión.

MATERIAL Y REACTIVOS.

- Placas de alúmina G (20 X 20 cm) 250 μ m
- Centrifuga
- Cromatógrafo de líquidos Varian LC 4100
- Fluoromonitor o detector de ultravioleta

- NaOH 2 N (100 μ l)
- 2, metil-1, butanol (5 ml)
- HCl concentrado (100 μ l)
- Na₂CO₃ (50 mg)
- Cloruro de dansilo (20.2 mg)
- Acetona (2 ml)
- Benceno (5 ml)
- Cloroformo-dioxano-isopropanol (45:2:5) o (45:2:1)
- Cloroformo (50 μ l)
- Cloroformo-trietilamina (50 : 1)
- Ciclohexano-cloruro de metilo-isopropanol (88.5 : 7:4)

PROCEDIMIENTO.

- La orina se colecta en botellas de polietileno y se mantiene bajo refrigeración.
- Se toman alícuotas de 2 ml y se almacenan a -20°C hasta que se efectúa el análisis.
- Cada alícuota, se ajusta a un pH de 10 ó 12 con NaOH 2N (100 μl) y se extrae con 2,metil-1, butanol (5 ml) en un embudo de separación durante 2 m.
- El extracto orgánico, se transfiere a un matraz al que se burbujea nitrógeno durante 30 m para eliminar el amoniaco.

HIDROLISIS:

- Se adicionan 100 μl de HCl concentrado, se mezcla y se evapora a 45°C a una presión de 0.2 mm de Hg.
- El residuo se trata con una solución de bicarbonato de sodio (50 mg/ml) y se mezcla.

FORMACION DE DERIVADOS:

La muestra se mezcla con cloruro de dansilo (20.2 mg, 75 mol) en acetona (2 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 12 h.

- Se evapora la acetona a 35°C en vapor de nitrógeno y al residuo se le agrega 1 ml de agua para disolver sólidos y 5 ml de benceno. Se agita en un embudo de separación durante 30 seg.
- El extracto bencénico (4.8 ml) se transfiere a una centrifuga y se evapara el solvente a 35°C en atmósfera de nitrógeno.
- El residuo se disuelve en cloroformo (25-50 μl) y las alícuotas de la solución, se someten a cromatografía en capa fina.

PURIFICACION:

- Las placas de alúmina G se emplean en análisis unidimensional con un

solvente de cloroformo-dioxano-isopropanol (45:2:5) o (45:2:1).

- Las placas se examinan con ultravioleta a 366 nm.
- Los puntos deseados se raspan y se extraen inmediatamente con una mezcla de trietilamina-isopropanol en volúmenes iguales (10 ml).
- Los extractos se evaporan a sequedad en una atmósfera de nitrógeno a 40°C y los residuos se almacenan a 2 ó 4°C hasta que son analizados por cromatografía de alta presión.

CROMATOGRAFIA DE ALTA PRESION:

- El análisis cromatográfico puede efectuarse en un cromatógrafo de líquidos Varian LC 4100 o bien, en un sistema compuesto por un inyector U6K, dos sistemas de flujo de solventes 6000 y un programador de solventes 660. Para la detección puede usarse un fluoromonitor LCD 1209 o un detector ultravioleta LDC a 280 nm.
- El sistema cromatográfico consiste en una columna de Corasil II de 120 cm X 2.2 mm y elución con una mezcla de cloroformo-trietilamina (50:1) con un flujo de 24 ml/h a temperatura ambiente (fig. 7.1).
- También se puede emplear un sistema de fase ligada en Micropak CN-10 y elución con ciclohexano-cloruro de metilo-isopropanol (88.5:7.5:4) con un flujo de 60 ml/h a una presión de 1600 psi (fig. 7.2) (84).

Por este método se consigue una separación excelente de las poliaminas dan siladas en menos de 25 minutos.

Los contaminantes polares, se eluyen antes que las poliaminas y no interfieren en la cuantificación.

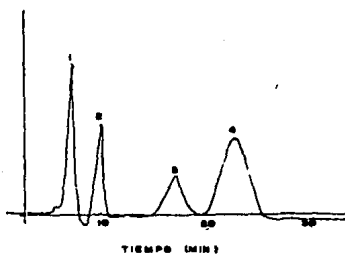


Fig. 7.1 Separación por CL-AP de una solución estándar que contiene 50 pmol de las dansil poliaminas. 1) ESM,2)ESD,3)PUT y 4)DAP (84).

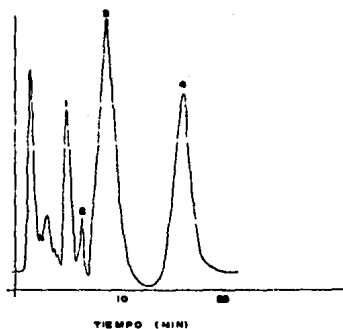


Fig. 7.2 Separación por CL-AP de una solución estándar de dansil poliaminas. 1) DAP, 2) PUT, 3) ESD y 4) ESM (84).

7.2 SUERO.

En la tabla 7.2 se muestran los principales métodos para el análisis de poliaminas en suero. Aunque el radioinmunoensayo es el método mas sensible y específico para el análisis de poliaminas en suero, es difícil su aplicación por la imposibilidad de evitar la reacción cruzada de los anticuerpos.

7.2.1 Cuantificación de poliaminas en suero por cromatografía de gas- espectrometría de masas.

La característica que mas afecta las determinaciones cuantitativas en los análisis cromatográficos, particularmente a niveles subnanomolares es la adsorción a la columna (o inversamente, la recuperación de las poliaminas). Otro problema, se relaciona con el manejo de la muestra, ya que las poliaminas se adsorben al material celular durante la preparación de las muestras de suero, así como al material de vidrio (particularmente la espermina) y a otros materiales. Además, existe la posibilidad de que las poliaminas se destruyan por la presencia de trazas metálicas, enzimas y bacterias.

Todos estos factores hacen necesario el uso de estándares internos para cada una de las poliaminas. Una alternativa, es el uso de análogos deuterados de las poliaminas.

El detector mas apropiado para diferenciar las poliaminas deuteradas de las endógenas, es el espectrómetro de masas, que conectado a un cromatógrafo de gases, puede emplearse con una alta sensibilidad y especificidad.

TABLA 7.2
PRINCIPALES METODOS PARA LA DETERMINACION DE POLIAMINAS EN SUERO

METODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	ECONOMIA	MUESTRA	PREPARACION	DERIVADO	REF.
CG-EM	1 pmol	di y poliaminas	*	0.3ml	Cromatografía en sílica	TFA	38
CG-EM	1 pmol 1 fmol (SIM)	di y poliaminas	** *	1 ml	Cromatografía en sílica	TFA y TrS	29
Cl-IC (anal. de aa)	1 pmol	di y poliaminas	*	2 ml	Desproteínezación con ac. sulfonilcálico, Purif. por Cl-IC	---	57
Cl. (anal. de aa)	1 pmol	di y poliaminas	*	7-6 ml	Hidrólisis, extracción butanol.	---	13
Cl-AP (anal. de aa)	1 nmol	di y poliaminas	*	2-5ml	Congulación y desproteí- nización con ac. sulfo- málico	OFA	65
Cl-AP	1 pmol	di y poliaminas	**	1 ml	Cromatografía en sílica	---	66
Cl-AP	0.1 nmol 5 pmol	di y poliaminas	**	0.5ml	Hidrólisis y purifica- ción por Cl.	fluorescencia	41 85
Cl-AP (fase reversa)	100 fmol	PUT, ESD y ESH	*	20µl	Desproteínezación	danilo	45
ENZIMÁTICO (a. oxidasa de soya)	1 nmol	PUT, ESD y ESH	***	0.5ml	Purificación en sílica	---	47
RLE	0.001nmol	di y poliaminas	**	20 µl	-----	---	66

* Poco accesible. ** Accesible. *** Muy accesible

MATERIAL Y REACTIVOS.

- Columna de intercambio iónico Bio Rad AG 50W-X2
- Aparato de ultrasonido
- Centrifuga
- Cromatógrafo de gases Varian 2700 con una columna empacada con OV-17 (3%) en Chromosorb W-HP 80/100
- Espectrómetro de masas Du Pont 21-49 1B

- Succinonitrilo (0.8 g)
- Platino (250 mg)
- Deuterioetanol (20 ml)
- Oxido de deuterio (30 ml)
- Etanol (el necesario)
- Glutaronitrilo (0.8 g)
- NaOH 4.8 N (0.4 ml)
- Acrilonitrilo (120 μ l)
- HCl 0.1 N, 6 N y 2.5 N (700 ml, 4 ml y 700 ml)
- Cloruro de deuterio (5 ml)
- Ninhidrina (la necesaria)
- Na₂CO₃ anhidro (100 mg)
- Anhídrido trifluoroacético (50 μ l)
- Cloroformo (1 ml)

PROCEDIMIENTO.

PREPARACION DE ANALOGOS DEUTERADOS.

Las poliaminas deuteradas que funcionan como estándares internos se prepa-

ran haciendo reaccionar los correspondientes nitrilos con deuterio (D_2) y platino en cloruro de deuterio y óxido de deuterio (DCl/D_2O) y por último con etanol.

Preparación de Putrescina- d_4 .

- Se prepara una mezcla de succinonitrilo (0.8 g, 10 mmoles) y óxido de platino (100 mg) en 20 ml de o-deuteroetanol (solución al 95% en óxido de deuterio de 99% de pureza) y 3 ml de cloruro de deuterio (solución al 37% en óxido de deuterio de 99% de pureza).

- Se mezcla a una presión de 2 atm de deuterio (99.5% de pureza) hasta que termina el consumo de gas.

- El producto obtenido después de separar el catalizador y evaporar los solventes a vacío, se recrystaliza de etanol al 100% para dar 0.66 g (41%) de PUT $d_4 \cdot 2HCl$ con un punto de fusión de $310^\circ C$ (p.f. PUT- $2HCl$: $315^\circ C$).

Preparación de Cadaverina- d_4 .

- Se prepara de manera similar a la PUT- d_4 pero por reducción de glutaronitrilo para dar cadaverina $d_4 \cdot 2HCl$ con un punto de fusión entre 258 y $260^\circ C$. El p.f. de la cadaverina endógena es de $275^\circ C$.

Preparación de Espermidina- d_6 y Espermina- d_8 .

- A una suspensión de 300 mg de PUT $d_4 \cdot 2HCl$ en 40 ml de etanol, se adicionan 0.4 ml de NaOH acuoso 4.8 N.

- Una vez preparada la solución se adicionan lentamente 120 μl de acrilonitrilo.

- La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 h.

- Se adicionan 4 ml de HCl 6N y se agita a presión reducida.

- Al residuo sólido en 30 ml de óxido de deuterio y 2 ml de cloruro de deute-

rio al 37% se adicionan 50 mg de óxido de platino y la mezcla se agita bajo presión de 2 atm de deuterio durante 36 h.

- El catalizador se separa por filtración y los solventes se evaporan bajo presión reducida y el residuo se redissuelve en agua.

- La solución se coloca en una columna (2 X 20 cm) intercambio iónico Bio-Rad AG 50W-X2 preparada por lavado con HCl 0.1N.

- La columna se eluye por un gradiente que se consigue colocando 300 ml de agua en un mezclador y añadiendo 700 ml de HCl 2.5 N.

- Se colectan fracciones de 15 ml. Las poliaminas son detectadas con ninhidrina.

- Las fracciones 28-37 se evaporan para dar 32 mg de ESD-d₆ · 3HCl.

- Las fracciones 52-67 dan 117 mg de ESM-d₈ · 4 HCl, después de recristalizar de etanol(38).

PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

- Se adicionan las siguientes cantidades de estándares deuterados a cada muestra de 10ml de suero: 11.2 nmol de PUT-d₄ · 2HCl, 12.6 nmol de ESD-d₆ · 3 HCl, 4.5 nmol de ESM-d₈ · 4HCl.

- La muestra se aplica a una columna de sílica gel.

- Después de que eluyen los primeros 0.5 ml de agua, empieza a separarse el suero libre de poliaminas.

- Cuando se aplican 10 ml de suero a la columna, los 8 primeros mililitros son libres de poliaminas.

- La columna se lava con otros 50 ml de agua.

- Las poliaminas se eluyen con HCl 0.01-0.03N.

- Si se colectan fracciones de 1ml, las poliaminas se recuperan en las frac

ciones 3 a 5.

FORMACION DE DERIVADOS.

- La solución de poliaminas purificadas se transfiere a un matraz de 1 ml y se evapora a sequedad bajo una atmósfera de nitrógeno.
- Se adicionan 100 mg de Na_2CO_3 anhidro y 50 μl de anhídrido trifluoroacético.
- El frasco se sella y se somete a ultrasonido por 15 m y se deja enfriar.
- Se adicionan 30 μl de cloroformo y 1 ml de una solución de Na_2CO_3 2M lentamente.
- La mezcla se agita y se centrifuga. Se separa la capa acuosa con una pipeta.
- Se agregan volúmenes adicionales de una solución de Na_2CO_3 para disolver el exceso de carbonato de sodio sólido.
- Se separa el último volumen de carbonato de sodio, dejando la solución de cloroformo cubierta por una capa muy delgada de solución acuosa.

CROMATOGRAFIA DE GASES.

- La separación de poliaminas se efectúa en un cromatógrafo de gases Varian 2700 conectado a un espectrómetro de masas Du Pont 21-49 IB.
- La columna del cromatógrafo es de 120 cm X 2 mm, empacada con OV-17 al 3% en Chromosorb W-HP 80/100.
- La temperatura inicia a 120° o 140°C y se lleva hasta 300°C a una velocidad de 15°C/m.
- La fig. 7.3 muestra los espectros de las poliaminas obtenidos por este método (29).

7.3 TEJIDOS.

La tabla 7.3 muestra los principales métodos para determinar poliaminas en tejidos. Como se puede observar, el método mas sensible es la cromatografía líquida de alta presión que utiliza derivados dabsilados de las poliaminas (40) que además tiene la ventaja de ser sencillo y de no requerir procesos laboriosos de purificación.

7.3.1 Determinación de poliaminas por cromatografía líquida de alta presión de sus derivados dabsilados.

El presente método emplea una elución de tipo isocrático y permite que la determinación espectrofotométrica se efectúe en la región visible, descartando cualquier posible interferencia por sustancias que absorben la luz ultravioleta y que podrían estar presentes en las muestras biológicas.

MATERIAL Y REACTIVOS.

- Homogenizador Polytron
- Columna de μ porasil (partículas porosas de 10 μ ;) de fase normal (30 cm X 3.9mm)
- Cromatógrafo líquido Waters ALC 201 con un inyector Universal 6000 A, un programador de solventes 660 y un fotómetro modelo 450
- Registrador Omniscrite modelo B 5000 (Houston Inst.)

- Acido perclórico al 2% (1 ml)
- Na_2CO_3 (30 mg)
- Cloruro de dabsilo (2.4 mg)

TABLA 7.3

PRINCIPALES METODOS PARA LA DETERMINACION DE POLIAMINAS EN TEJIDOS

METODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	ECONOMIA	MUESTRA	PREPARACION	DERIVADO	REF.
CG	1 nmol	di y poliaminas	**	n.r.	Extracción con BuH	—	52
CL-IC	1 nmol	di y poliaminas	***	22mg	Extracción con ac.TCA	---	37
CL-IC (anal. de aa)	10 pmol	di y poliaminas	*	n.r.		---	72
CL (anal. de aa)	1 nmol	di y poliaminas	*	n.r.	Extracción con ac.TCA	---	60
CCF	0.03nmol 7.4nmol	PUT	***	n.r.	Separación por CL-IC	dansilo	76 77
CCF-IC	1 nmol	di y poliaminas	**	n.r.	Extracción con ac.TCA	dansilo	75
CL-AP	0.5 nmol	di y poliaminas	**	50mg	Homogenización con HClO ₄ CL-IC	Fluoresceína	41
CL-AP (fase reversa)	1 nmol	PUT,ESD y ESM	**	n.r.	Homogenización HClO ₄ , Na ₂ SO ₄ y EDTA	OFA	43,83
CL-AP	0.5nmol	PUT,ESD y ESM	**	n.r.	Extracción con ac. sul fosalicílico	OFA	103
CL-AP	20pmol	PUT, ESD y ESM	**	n.r.	Extracción con HClO ₄	dansilo	40
ENZIMATICO * (soya)	1 nmol	PUT,ESD y ESM	***	0.5ml	Purif. por CL-IC	—	47
ENZIMATICO (suero)	0.01 μmol	poliaminas	***	1 ml	Purif. por CL-IC	—	24

* Poco Accesible. ** Accesible. *** Muy Accesible.

- PUT 2HC1, ESD 3HC1 y ESM 4HC1 (250 nmól)
- Acetona (3.5 ml)
- Glicina (5 mg)
- Benceno (5 ml)
- Sulfato de sodio anhidro (0.5 g)
- Cloroformo (50 ml)

PROCEDIMIENTO.

- A 1 ml de solución de ácido perclórico al 2%, que contiene PUT, ESD y ESM (10-250 nmol), se agregan 30 mg de carbonato de sodio y 1.6 mg de cloruro de dabsilo en 1 ml de acetona.
- La mezcla se agita y se deja reposar a temperatura ambiente durante 1
- Se adiciona un exceso de cloruro de dabsilo (0.8 mg en 0.5 ml de acetona) manteniendo la misma temperatura durante 30 m para asegurar la culminación de la reacción. El exceso de cloruro de dabsilo se consume por reacción con glicina (5 mg en 0.5 ml de agua) durante 30 m.
- La mezcla resultante se extrae con 5 ml de benceno y la capa orgánica, se lava dos veces con 5 ml de agua y se deshidrata con sulfato de sodio anhidro (0.3-0.5 g).
- Se toma una alícuota de 5 a 20 μ l del extracto bencénico para el análisis por CL-AP.
- Se separan los tejidos y se homogenizan al 10% con una cantidad suficiente de ácido perclórico al 2%.
- Se centrifuga a 800 X g durante 15 m y se toman 2 ml del sobrenadante y se mezclan con 2 ml de acetona.
- La mezcla resultante se centrifuga nuevamente a 800 X g 15 m.

- Se toman alícuotas de 1 ml de sobrenadante para la determinación.

SEPARACION DE LAS POLIAMINAS DABSILADAS.

_ La columna de μ porasil se equilibra a una velocidad de 1 ml/m con acetona en cloroformo al 2%.

- Se inyectan de 5 a 20 μ l de solución de poliaminas dabsiladas.
- La elución se efectúa isocráticamente con la misma mezcla de solventes.
- La fig. 7.4 representa el patrón de separación de las poliaminas dabsiladas. La espermidina y el amoníaco no se separan adecuadamente en este sistema. Afortunadamente, el contenido de amoníaco en la mayoría de los tejidos, no interfiere con la determinación de espermidina (40).

7.4 OTROS MATERIALES BIOLOGICOS.

La determinación de poliaminas se ha reportado en diversos materiales biológicos.

Algunos de los métodos y sus características se resumen en la tabla 7.4.

TABLA 7.4

PRINCIPALES METODOS PARA DETERMINAR POLIAMINAS EN DIVERSOS MATERIALES BIOLÓGICOS

MUESTRA	METODO	SENSIBILIDAD	PURIFICACION	DERIVADO	REF.
VIRUS	CCF	0.5 nmol	Buqueo, aislamiento y purificación de nucleocáps. des.	danilo	5,79
RNA	CCF	0.03 nmol	Extracción con butanol. Purif. en Sephadex G 10D	danilo	26
PLACENTA	CG-EM	7.4 nmol		TFA	2
FLUIDO AMNIOTICO	CCF	0.01 nmol	Centrifugación y liofilización	danilo	80
LQ. CEFALORQUINO	CL-AP	1 pmol	Centrifugación, liofilización e hidrólisis		
CELULAS LEUCICAS	CCF	0.01 nmol		danilo	76
MICROORGANISMOS	CG CL-IC	n.r. 1 nmol		TFA	14 37
VEGETALES	CG CL-APrev. CCF	0.3 pmol 0.1 nmol n.r.		benzilo danilo	28 17 17
MEDULA OSEA	CL	0.1 nmol	Extracción, centrifugación y liofilización		70
SANGRE	CL CL-IC	0.1 nmol 7.4 pmol	Fraccionamiento Desproteíntación e hidrólisis		3 57
GLÓBULOS ROJOS	CL-APrev.	100 fmol	Desproteíntación con HCl	danilo	45
SEMEN	CL-IC	0.001 nmol	Extracción con Ac. TCA y centrifugación		56
MEMBRANA BACTERIANA	CL-AP	0.1 pmol		benzilo	67
ALIMENTOS	CG CG	12.5nmol 7.4nmol		EDC PFF	18 19

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES.

Las poliaminas son bases nitrogenadas no proteicas de bajo peso molecular, ampliamente distribuidas en sistemas biológicos e implicadas en procesos de crecimiento normal o neoplásico.

Su determinación en tejidos y fluidos fisiológicos, puede proporcionar una valiosa prueba como complemento en el diagnóstico del cáncer, además de una ayuda en el control de la terapia.

Un método ideal para la determinación de poliaminas debe tener una sensibilidad mínima de pmoles, requerir una mínima preparación de muestras, no ser extremadamente caro y permitir el análisis de un gran número de muestras.

Todos los métodos aquí expuestos, son útiles para la determinación de poliaminas, siempre y cuando se mantenga un control adecuado de las condiciones de cada uno de ellos, de manera que la selección depende de los recursos y necesidades particulares.

No obstante, la cromatografía de capa fina, así como los métodos enzimáticos, se recomiendan como una buena opción para el análisis de rutina debido a que permiten la determinación cuantitativa rápida de un gran número de muestras sin necesidad de un equipo costoso.

Los demás métodos cromatográficos, como cromatografía líquida de alta presión y cromatografía de gas, son similares en muchos aspectos: requieren manejo preanalítico, emplean instrumentación

compleja y están limitados en el número de análisis que pueden efectuarse en un tiempo dado, no obstante, son muy rápidos y sensibles.

El Radioinmunoensayo, es muy sensible, no requiere preparación de la muestra ni equipo costoso, además de que permite efectuar muchas determinaciones. Será una herramienta muy útil cuando se produzcan anticuerpos específicos para cada una de las poliaminas.

APENDICE

I

NIVELES NORMALES DE POLIAMINAS EN FLUIDOS FISIOLÓGICOS

TIPO	METODO	UNIDADES	RANGO		
			PUT	ESD	ESM
Plasma/Suero	CII	nmol/ml	0.07-0.15	0-0.12	0-0.16
	RIE	nmol/ml	0.13	0.14-0.64	0.03-0.06
Fluido cerebroespinal	CII	pmol/ml	76-292	54-246	0- trazas
Orina	CGL	mg/24h	1.26	1.06	0.28
	CII	mg/24h	0.2-2.84	0.36-2.1	0 - 0.87
	CII	µg/mg creat.	1.6-3.4	1-2.5	0 - 0.9
	CFE	mg/24h	5.0	2.0	0.5

(6)

II
NIVELES DE POLIAMINAS EN ALGUNAS ENFERMEDADES MALIGNAS Y
NO MALIGNAS

ENFERMEDAD	MUESTRA	FRECUENCIA APROXIMADA DEL AUMENTO DE UNA POLIAMINA (%)
Glioblastoma, meduloblastoma	FCE	100 (putrescina)
Adenoma pituitario, astrocitoma	FCE	20,70 (espermidina)
leucemia linfática	O	no reportada
leucemia miéltica	O,S	75(suero ESD) n.r.(O)
Policitemia vera	P	55 (espermidina)
Cáncer hemático indefinido	O	no reportada
Mal de Hodgkin	O	no reportada
Linfosarcoma	O	no reportada
Sarcoma	S	50 (putrescina)
Melanoma maligno	S,O	30-70 (PUT o ESD)
Cáncer pulmonar	O	50-90 (PUT o ESD)
Cáncer de estómago	O	resultados variables
Cáncer de páncreas	O	30 (putrescina y ESM)
Cáncer colorectal	O,S	50-65 (ESD o ESM)
Cáncer de riñón	O	80 (ESD o ESM)
Cáncer de próstata	O	70 (ESD)
Cáncer mamario	O	25 (ESM)
Cáncer uterino	O	60 (ESD y ESM)
Varios tipos de cáncer	S	100 (ESM)
Uropatologías benignas	O	20 (ESM)
Neuropatologías benignas	O	Control

FCE:Fluido cerebroespinal,O: Orina, S:Sangre

III

NIVELES DE DIAMINAS EN ALGUNOS PRODUCTOS MARINOS

PRODUCTO	CALIDAD	RANGO $\mu\text{g/g}$	
		cadaverina	putrescina
Salmón, enlatado	aceptable	0-1	3-4
	descompuesto	18-81	5-12
Salmón, congelado	aceptable	0-1	3-4
	descompuesto	0-8	4-5
Atún, enlatado	aceptable	1-2	0-1
	descompuesto	109	8
Camarón	aceptable	3	5-10
	descompuesto	6-19	15-58

(19)

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Méndez, J.D. y Hicks, J.J. (1983). Metabolismo y función de las poliaminas en células vegetales. Rev. Soc. Quim. Mex. 27 (4):169-173.
- 2.- Porta, R., Servillo, L., Abbruzzese, A. y Della Pietra, G. (1978). Automated Chromatographic analysis of human placenta polyamines. Biochem. Med. 19: 143-147
- 3.- Cohen, L.F., Lundgren, D.W. y Farrell, P.M. (1976). Distribution of Spermine and Spermidine in blood from Cystic Fibrosis patients and control subjects. Blood. 48(3):469-474.
- 4.- Kneip, B., Raymondjean, M., Bogdanousky, D., Bachner, L. y Shapira, G. (1979). An improved and easy technique for polyamine determination in biological samples. J. Chromatogr. 162:547-559.
- 5.- Gibson, A.W. y Roizman, B. (1971). Compartmentalization of Spermine and spermidine in the herpes simplex virion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 2818-2821.
- 6.- Jänne, J., Poso, H. y Raina, A. (1978). Polyamines in rapid growth and cancer. Biochem. Biophys. Acta. 473: 241-293.
- 7.- Raina, A. (1963). Determination of Spermidine and Spermine. Acta Physiol. Scand. 60(218-7):22-82.
- 8.- Dreyfuss, G., Dvir, R., Harrell, A. y Chayen, R. (1973). Determination of polyamines in urine by thin layer chromatography. Clin. Chim. Acta. 49: 65.
- 9.- Hayashi, T., Sugiura, T., Kawai, S. y Ohno, T. (1978). High speed liquid chromatographic determination of putrescine, spermidine and spermine in human urine. J. Chromatogr. 145: 141-146.

- 10.- Russell,D.H. (1971). Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. Nature (New Biol.). 233; 744-745.
- 11.- Marton,L.J.,Vaughn,J.G.,Hawk,I.A.,Levy,R. y Rusell,D.H. (1973). Polyamines in Normal and Neoplastic Growth. D.H. Russell Ed.. Raven Press, N.Y. :367.
- 12.- Heby,O. y Andersson,G. (1978). Simplified micromethod for the quantitative analysis of putrescine, spermidine and spermine in urine. J.Chromatogr. 145: 73-80.
- 13.- Nishioka,K.,Romsdahl,M.,Fritsche,H.A.,y Johnston,D.A. (1978). Polyamines in sera of patients with solid tumors. Advances in Polyamine Research. Vol. 2. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.:265-269.
- 14.- De Rosa,M. (1976). Occurrence and characterization of new polyamines in the extreme termophile Caldariella acidophila. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39 (1): 253-261.
- 15.- Kullnig,R.,Rosano,L.,y Hurwitz,C. (1970). Identification of 2-hydroxy putrescine in a pseudomona lacking spermidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39: 1145-1148.
- 16.- Nickerson, K.W. (1974). Absence of spermine in filamentous fungi. J. Bacteriol. 129 (1): 173-176.
- 17.- Flores, H.E.,y Galston A.W. (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. Plant Physiol. 69: 701-706.
- 18.- Yamamoto,S.,Itano,H,Kataoka,H. y Makita,M. (1982). Gas liquid chromatographic method for analysis of di-and polyamines in foods. J. Agric.Food Chem. 30(3): 435-439.

- 19.- Staruszkiewicz, W.F. y Bond, J.F. (1981). Gas Chromatographic determination of cadaverine, putrescine and histamine in foods. J. Assoc. OFF. Anal. Chem. 64(3):584-591.
- 20.- Doyle, D.G. (1978). Analysis of polyamines. Advances in Polyamine Research. Vol. 2. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.: 3-4.
- 21.- Bachrach, U. (1978). Analytical methods for polyamines. Advances in Polyamine Research. Vol. 2. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.:5.
- 22.- Rosenthal, S.M. y Tabor, C.W. (1956). The pharmacology of spermine and spermidine. Distribution and excretion. J. Pharmacol. Exp. Ther. 116: 131-138.
- 23.- Bachrach, U. y Oser, I.S. (1963). Enzymatic Assay for spermidine. J. Biol. Chem. 238(6):2098-2101.
- 24.- Bachrach, U. y Reches, B. (1966). Enzymatic Assay for Spermidine and spermine. Anal. Biochem. 17.:38-48.
- 25.- Beyer, C., y Van der Ende, A. (1983). Improved separation procedure for urinary di- and polyamines by means of thin layer chromatography. Clin. Chim. Acta. 129(2):211-214.
- 26.- Cohen, S.S., Morgan, S., y Streibel, E. (1969). The polyamine content of the tRNA of *E. coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64: 669-676.
- 27.- Veening, H., Pitt, W.W., y Jones, G. (1974). Ion exchange chromatography separation and fluorometric detection of urinary polyamines. J. Chromatogr. 90: 129-139.
- 28.- Smith, T.A. (1970). The quantitative estimation of putrescine by gas chromatography. Anal. Biochem. 313: 810-815.

- 29.- Smith,R.G.,Daves,G., y Grettie,D.P. (1978). Gas Chromatography- Mass Spectrometry in analysis of polyamines. Advances in Polyamine Research Vol. 2. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.:23-33.
- 30.- Makita,M.,Yamamoto,S.,y Kono,M. (1975). Rapid determination of di- and polyamines in human urine by electron capture gas chromatography. Clin. Chim. Acta. 61: 403-405.
- 31.- Makita,M.,Yamamoto,S.,Miyake,M.,y Masamoto,K. (1978). Practical Gas Chromatographic method for the determination of urinary polyamines. J. Chromatogr. 156: 340-345.
- 32.- Rattenbury,J.M.,Lax,P.M.,Blau,K.,y Sandler,M. (1979). Separation and quantification of urinary di-and polyamines by gas chromatography with electron capture detection. Clin. Chim. Acta. 95:61-67.
- 33.- Bartos,D.,Campbell,R.A.,Bartos,F., y Grettie,D.P. (1975). Direct determination of polyamines in human serum by radioimmunoassay. Cancer Res. 35: 2056-2060.
- 34.- Bartos,B.,Bartos,D. (1978). Antipolyamine Antibodies. Advances in Polyamine Research. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.:65-69.
- 35.- Quash,G.A.,Niveleau,A.,Au Poix,M. y Greenland,T. (1976). Immunolates visualisation of cell surface Forsmann and polyamine antigens. Exp. Cell Res. 98: 253-261.
- 36.- Vendemark,F.L.,Schmidt,G.J.,y Slavin,W. (1978). Determination of polyamines by liquid chromatography and precolumn labelling for fluorescence detection. J. Chromat. Sci. 16: 465-469.
- 37.- Tabor,H.,y Tabor, C.W. (1973). Quantitative determination of aliphatic diamines and polyamines by an automated liquid chromatography procedure. Anal. Biochem. 55: 457-467.

- 38.- Daves,D. (1983). Gas Chromatographic - Mass Spectrometric analysis of polyamines and polyamine conjugates. Methods in Enzymology. 94. Academic Press Inc.:48-54.
- 39.- Giumanini,A. (1976).N-permethylation of polyamines for Gas-Chromatographic and Mass spectrometric analysis. Anal. Chem: 48(3):484-488.
- 40.- Lin,J.K.,y Lai,Ch.Ch. (1982). Chromophoric determination of putrescine spermidine, and spermine with dabsyl chloride by high performance liquid chromatography and thin layer chromatography. J. Chromatogr. 227: 369-377.
- 41.- Samejima,K.,KAwase,M.,Sakamoto,S.,Okada,M. y Endo,Y. (1976). A sensitive fluorometric method for the determination of aliphatic diamines and polyamines in biological materials by high speed liquid chromatography. Anal. Biochem. 76: 392-406.
- 42.- Matsuzaki,S.,Hamana,K.,Imai,K.,y Matsuura,K. (1982). Occurrence in high concentrations of N-acetylspermidine and sym-homospermidine in the hamster epididymis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107(1):307.
- 43.- Wagner,J.,Clavenie,N.y Danzin,Ch. (1984). A rapid high performance procedure for the simultaneous determination of methionine,ethionine, S-adenosylmethionine and the natural polyamines in rat tissues. Anal. Biochem.140:108-116.
- 44.- Skaaden,T. y Greibrokk,T. (1982). Determination of polyamines by pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and ethanethiol in combination with reversed phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 247: 111-122.
- 45.- Brown,N.D.,y Strickler,P.(1982). Femtomolar ion pair high performance liquid chromatography method for determining Dns-polyamine derivatives of red blood cell extracts utilizing an automated polyamine analyzer. J. Chromatogr. 245: 101-108.

- 46.- Harik,S.I.,Pasternak,G.W., Snyder,S.H.,Gavril,W.P. y Salomon,H.S. (1973). An enzymatic isotopic microassay for putrescine. Biochim. Biophys. Acta. 304: 753-764.
- 47.- Fagerström,R.,Seppänen,P. y Jänne,J. (1984). A rapid chemiluminescence based method for the determination of total polyamines in biological samples. Clin. Chim. Acta. 143:45-50.
- 48.- Bonnefoy - Roch,A.M.y Quash,G.A. (1978). Development of Immunolateral procedures for measuring bound polyamines . Advances in Polyamine Research. Vol.2. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.:55-63.
- 49.- Bartos,D.,Campbell,R.A., Bartos,F. y Grettie,D.P. (1975). Direct determination of polyamines in human serum by radioimmunoassay. Cancer Res. 35: 2056-2060.
- 50.- Bachrach,U. (1973). Function of Naturally Occuring Polyamines. Academic Press Inc. N.Y.: 2.
- 51.- Inoue,H.,Mizutani,A. (1973). A new method for the isolation of polyamines from animal tissues. Anal. Biochem. 56:408-416.
- 52.- Beninati,S. (1977). A new method for qualitative and quantitative determination of di-and polyamines in animal tissues by gas liquid chromatography. Anal. Biochem. 80:101-107.
- 53.- Dreyfuss,G. (1973). Determination of polyamines in urine. Clin. Chim. Acta. 49: 65-72.
- 54.- Seale,T.W.,Chan W.Y.,Shukla,J.B. y O. Rennert.(1979). Isolation and characterization of a polyamine-peptide conjugate from human amniotic fluid. Clin. Chim. Acta. 95: 461-472.
- 55.- Patt,L.M. (1981). Abnormal behavior of polyamines on gel filtration: A cautionary note. Cell Biol. Int. Rep. 5(8): 797-802.

- 56.- Leone, E., De Prisco, Aniballo, N. y LaMontagna, R. (1981). Polyamines in human semen. Advances in Polyamine Research. Vol. 3. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.:473-477.
- 57.- Adler, H., Margoshes, M., Snyder, L.R. y Spitzer, C. (1977). Rapid chromatographic method to determine polyamines in urine and whole blood. J. Chromatogr. 143: 125-136.
- 58.- Fennessy, M.R. (1981). Isolation and determination of tissue spermidine using Bio-Rex 70. Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol. 3(1): 41-49.
- 59.- Ludowieg, J.J. (1979). Separation of polyamines by polyacrylamide gel exchange chromatography. J. Chromatogr. 171: 497-499.
- 60.- Seiler, N. (1982). Liquid Chromatographic methods for assaying polyamines using prechromatographic derivatization. Methods in Enzymology 94. Academic Press:10-47.
- 61.- Abdel-Monem, M.M., y Merdrik, J.L. (1981). Determination of monoacetyl diamines and polyamines in urine by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 222: 363-370.
- 62.- Grettie, D.P. (1978). Purification of radiolabeled polyamines and isolation of polyamines from serum by silica gel chromatography. Advances in Polyamine Research. Vol. 2. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.:13-21.
- 63.- Stock, R.A. (1978). Chromatographic Methods. Science Paperbacks. 3a. Ed.
- 64.- Gehrke, Ch.W. (1977). Polyamines, an improved automated ion exchange method. J. Chromatogr. 143: 345-361.
- 65.- Desser, D. (1980). Rapid detection of polyamines in the sera of patients with colorectal carcinoma by liquid ion exchange chromatography. Oncology 37:376-380.

- 66.- Bartos,F.,Bartos,D.,Grettie,D.P. y Campbell,R.A. (1977). Polyamine levels in normal human serum. Comparison of analytical methods. Biochim. Biophys. Res. Commun. 75(4): 915-919.
- 67.- Redmond,J.W., y Tseng,A.(1979). High pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine , spermidine and spermine. J. Chromatogr. 170: 479-481.
- 68.- Pharmacia Fine Chemicals. (1985). Ion Exchange Chromatography. Principles and methods.
- 69.- Johnson,E.L. y Stevenson,R. (1978). Basic Liquid Chromatography. Varian Associates, Inc.
- 70.- Rennert,O.,Miale,T.,Shukla,J.,Lawson,D.y Frias,J.(1976). Polyamine concentrations in Bone marrow aspirates of children with leukemia and other malignancies. Blood 47(4):695-793.
- 71.- Oshima,T. (1975). Thermine: A new polyamine from an extreme thermophile. Bioch. Biophys. Res. Commun. 63(4): 1093-1098.
- 72.- Perini,F.,Beck,S.J. y Venetta,H. (1979). Fluorometric analysis of polyamines, histamine and L-methylhistamine. Anal. Biochem. 94: 431-439.
- 73.- Rinaldini,L.M. (1970). Quantitative Chromatography of polyamines and related compounds with cation exchange resin paper. Anal. Biochem. 36:352-367.
- 74.- Seiler,N. (1983). Thin layer chromatography and thin layer electrophoresis of polyamines and their derivatives. Methods in Enzymology 94. Academic Press: 3-9.
- 75.- Bardócz,S.,Karsar,T. (1981). Determination of polyamines by ion exchange thin layer chromatography and video-densitometry. J. Chromatogr. 223: 198-201.

- 76.- Heby,O.(1973). Polyamine content of AKR Leukemic cells in relation to the cell cicle. Cancer Res.33: 2959-2964.
- 77.- Seiler,N.y Askar, A. (1971). A micromethod for the determination of putrescine in tissues. J. Chromatogr. 62: 121-127.
- 78.- Yatsunami,T. (1981). Identification of macrocyclic polyamines and macrocyclic dioxopolyamines by thin layer chromatography, gas chromatography and electrophoresis. Anal. Chem. 53: 477-480.
- 79.- Fout, G.S.,Kodandera,C.,y Medappa,J.E.(1984). Radiochemical determination of polyamines in poliovirus and human rhinovirus 14. J. Biol.Chem.259(6):3639-3643.
- 80.- Chan,W.Y.,Seale,T.W.,Shukla,J.B.y Rennert,O.M.(1979).Polyamine conjugates and total polyamine concentrations in human amniotic fluid. Clin.Chim.Acta.91:233-241.
- 81.- Shirahata.(1983). Detection of spermine and thermospermine by thin la yer chromatography. J. Chromatogr. 262: 451-454.
- 82.- Horváth,C. (1980). HPLC. Advances and Perspectives. Vol.2. Academic Press: 4-10.
- 83.- Wagner,J.,Danzin,Ch. y Mamont,P. (1982). Reversed phase ion pair liquid chromatographic procedure for the simultaneous analysis of S-adenosylmethionine, it's metabolites and the natural polyamines. J. Chromatogr. 227: 349-368.
- 84.- Abdel-Monem,M.M.,Ohno,K., Newton,N.E. y Weeks,Ch.E. (1978). Thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography of the dan syl polyamines. Advances in Polyamine Research. Vol.2. R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y.: 37-49.

- 85.- Kai,M.(1979). High performance liquid chromatographic determination of free and total polyamines in human serum as fluorescamine derivatives. J. Chromatogr.: 163:151-160.
- 86.- Gittins,M.y Cooke,K.B. (1978). The detection and determination of polyamines from human urine. Biochem.Soc. Trans. 57(6): 212-214.
- 87.- Seiler,N. (1983). Ion pair partition chromatographic separation of polyamines and their monoacetyl derivatives. Methods in Enzymology. 94: 25-29.
- 88.- Willard,H.H.,Merritt,L.L. y Dean,J.A.(1974).Métodos Instrumentales de Análisis. Compañía Editorial Continental,S.A.,México.561-569.
- 89.- Lewis,W. (1977).Identification of the unusual polyamines 3,3'-diaminodipropylamine and N,N' Bis(3 aminopropyl)-1,3-Propanediamine in the white shrimp Penaeus setiferus. Biochem.Biophys. Res. Commun. 77(3): 1103-1107.
- 90.- Fujihara,S.(1982). Occurrence of a new polyamine canavalmine in the sword bean Canavalia gladiata. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107(1): 403-410.
- 91.- Pomeranz,Y. y Meloan,C.E. (1978). Food analysis:Theory and Practice. Avi Publishing Co,Inc. Westport,Connecticut.
- 92.- Bergmeyer,H.V.(1975). Methods of Enzymatic Analysis. Vol.1. Verlag Chemie. Academic Press: 94-127.
- 93.- Matsumoto,T.,Suzuki,O.,Katsumata,Y,Oya,M.,Nimura,Y. y Hattori,T.(1981) A fluorometric assay for total diamines in human urine using human placental diamine oxidase. Clin.Chim.Acta 112:141-148

- 94.- Matsumoto,T., Suzuki, O., Katsumata,Y., Oya, M., Suzuki,T., Nimura, Y.,Hattori,T. (1981). A new enzymatic assay for total diamines and polyamines in urine of cancer patients. J. Cancer Res.Clin.Oncol.100: 73-84.
- 95.- Kubota,S., Okada,M., Imahoro,K.,y Ohsawa,N.(1983). A new simple enzymatic assay method for urinary polyamines in urine. Cancer Res. 43: 2363-2367.
- 96.- Quash,G.A. (1978). Cell membrane polyamines: A qualitative and quantitative study using immunolates and Tritiated antipolyamine antibodies. Advances in Polyamine Research. Vol.2. R.A.Campbell Ed. Raven Press N.Y. :85-91.
- 97.- Bartos,F. (1978). Section Introduction. Polyamines and Immunology. Advances in Polyamine Research. Vol.2: R.A. Campbell Ed. Raven Press N.Y. :53-59.
- 98.- Bartos,D., Bartos,F.,Campbell,R.A. y Grettie,D.P. (1960). Antibody to Spermine: A natural biological constituent. Science (208)6:1178-1180.
- 99.- Ripoll,J.P., Roch,G.M., Quash,G.A. y Granje,J. (1980). An automatic continuous flow method for the determination of antipolyamine antibodies in human sera. J. Immunol. Methods. 33: 159-173.
- 100.- Margni,R.A. (1982). Inmunología e Inmunoguímica. Editorial Médica Panamericana. 3a. Edición. Buenos Aires, Argentina: 482-483.
- 101.- Fujiwara,K. (1983). Preparation of polyamine antibody and its use in enzyme immunoassay of spermine and spermidine with D-Galactosidase as a label. J. Immunol.Methods. 61: 217-226.

- 102.- Isobe,K., Tani, Y. y Yamada,H. (1981). Differential determination procedure for putrescine, spermidine, and spermine with polyamine oxidase from fungi and putrescine oxidase. Agric. Biol. Chem. 65(3): 727-733.
- 103.- Shaw,G.G., Al Deen, I.H.S. y Elworthy,V.M. (1980). The construction and performance of a low cost automated HPLC system for polyamine assay. J. of Chromat. Sci. 18: 166-170.

RESUMEN

Las poliaminas, putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (ESD) y espermina (ESM) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza.

Su incremento en tejidos en crecimiento y en tejidos cancerosos sugiere su utilidad como indicadores de la eficacia de la terapia en pacientes cancerosos y con otras enfermedades.

Esto hace importante el desarrollo de métodos analíticos precisos y sensibles para determinar poliaminas en materiales biológicos.

Muchos métodos se han reportado, principalmente: cromatografía en capa fina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de gas, métodos enzimáticos y métodos inmunológicos.

Los métodos de cromatografía líquida son bastante específicos y moderadamente sensibles. Su sensibilidad puede aumentarse si las poliaminas se hacen reaccionar con ciertas sustancias para formar derivados detectables por sus altos coeficientes de extinción molar o por su intensa fluorescencia.

La cromatografía de gas se ha adaptado a la espectrometría de masas para el análisis de poliaminas resultando un método sumamente rápido y sensible pero que requiere de un extenso manejo preanalítico.

Los procedimientos enzimáticos están basados en la formación de compuestos cíclicos por oxidación de las poliaminas, que sirven como base a ensayos colorimétricos y fluorométricos.

Los métodos enzimáticos emplean amino oxidasas muy diversas; ya sea de Se-

rratia marcescens, de frijol de soya o séricas.

Recientemente, se han preparado anticuerpos contra las poliaminas, que al hacerse reaccionar con éstas, producen una aglutinación que permite su cuantificación; desafortunadamente, se observa una reacción cruzada bien definida entre las diferentes poliaminas.

En el presente trabajo, se exponen los procedimientos de extracción y purificación de poliaminas de los diferentes tipos de muestras, las características y ventajas de los métodos mas confiables y por último, se describen algunos métodos para determinar poliaminas en orina, sangre y tejidos.