

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE  
DIMETILARGININA ASIMÉTRICA EN MUJERES GESTANTES Y SUS  
NEONATOS**

**Esteban Camilo Toro Alzate**



**UNIVERSIDAD DEL VALLE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA**

**Santiago de Cali**

**2014**

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE  
DIMETILARGININA ASIMÉTRICA EN MUJERES GESTANTES Y SUS  
NEONATOS**

**Esteban Camilo Toro Alzate**

**Trabajo de grado requisito para optar por el título de Químico**

**Directora: Ana Cecilia Aguilar de Plata. M.Sc**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA**

**Santiago de Cali**

**2014**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA**

**Esteban Camilo Toro Alzate**

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE  
DIMETILARGININA ASIMÉTRICA EN MUJERES GESTANTES Y SUS  
NEONATOS**

**Palabras Claves:** Derivatización, dimetilarginina asimétrica, dimetilarginina dimetilaminohidrolasas, endotelio, fluorescencia, orto-ftalaldialdehído, óxido nítrico, proteína arginina metiltransferasa.

**Santiago de Cali**

**2014**

### **Nota de aceptación**

El trabajo de grado titulado “*DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE DIMETILARGININA ASIMÉTRICA EN MUJERES GESTANTES Y SUS NEONATOS*” presentado por el estudiante Esteban Camilo Toro Alzate para optar al título de Químico en la Universidad del Valle, fue revisado por el jurado y calificado como:

---

Ana Cecilia Aguilar de Plata, M. Sc.

Directora del trabajo

---

Jurado

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias primordialmente a Dios que me dio salud, perseverancia y apoyo durante todo este proceso de aprendizaje y lo más importante me dio la vida y las aptitudes para culminar cada una de mis metas y sueños.

A mi madre que es el principal apoyo en mi vida y la mejor maestra que he tenido; sin su paciencia, dedicación, preocupación, alegría y fortaleza no hubiera llegado ni a la mitad de lo que soy y lo que seré. A mi familia en general por su apoyo, consejos y disposición para colaborarme en cualquier momento.

A la doctora Cecilia Aguilar de Plata, por su apoyo, colaboración y por haberme permitido pertenecer a su grupo de investigación.

Al profesor Norberto Benitez por su paciencia, sus ideas y su colaboración durante mi trabajo de grado y al profesor Dorian Polo por compartir su conocimiento y por los consejos brindados durante mi última etapa de formación.

A la Dra. Isabella Echeverri por toda su colaboración, disposición y conocimiento durante el desarrollo de mi trabajo de grado.

Al jurado por tomarse el tiempo de revisar este documento y hacer sus comentarios sobre el trabajo.

A mis amigos y compañeros Christian Carmona, Angie Davalos, Laura Salas y Pablo Micolta por su apoyo y por todas las cosas que me enseñaron durante estos cinco años de mi vida, porque sé que su acompañamiento facilitó mucho el camino del aprendizaje de esta ciencia tan hermosa.

A cada uno de los integrantes del grupo de Bioquímica, siempre dispuestos a ayudar, Alejandra, Diana, Lorena, Laura, Cesar y Frankly.

A Eliecer Jimenez Charris por su amistad, acompañamiento, conocimiento brindado y toda su colaboración en mi proyecto de trabajo de grado.

A todas esas personas que de una u otra forma colaboraron para lograr culminar este proyecto. ¡MUCHAS GRACIAS!

## **TABLA DE CONTENIDO**

|             |                                                   |           |
|-------------|---------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>   | <b>RESUMEN</b>                                    | <b>10</b> |
| <b>2.</b>   | <b>INTRODUCCIÓN</b>                               | <b>11</b> |
| <b>3.</b>   | <b>OBJETIVOS</b>                                  | <b>13</b> |
| <b>3.1.</b> | Objetivo general                                  | 13        |
| <b>3.2.</b> | Objetivos específicos                             | 13        |
| <b>4.</b>   | <b>MARCO TEÓRICO</b>                              | <b>14</b> |
| <b>4.1.</b> | Dimetilarginina Asimétrica (ADMA)                 | 14        |
| <b>4.2.</b> | Proteína arginina metiltransferasa (PRMT)         | 15        |
| <b>4.3.</b> | DDAH y CATs                                       | 18        |
| <b>4.4.</b> | Óxido Nitrico                                     | 21        |
| <b>4.5.</b> | Derivatización                                    | 23        |
| <b>5.</b>   | <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> | <b>25</b> |
| <b>6.</b>   | <b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b>                   | <b>26</b> |
| <b>6.1.</b> | Materiales                                        | 26        |
| <b>6.2.</b> | Preparación Buffer Borato de Potasio (200mM)      | 26        |
| <b>6.3.</b> | Preparación Buffer Fosfato de Potasio             | 26        |
| <b>6.4.</b> | Solución de derivatización                        | 26        |
| <b>6.5.</b> | Preparación de los estándares                     | 28        |
| <b>6.6.</b> | Preparación y derivatización de las muestras      | 28        |
| <b>6.7.</b> | Condiciones Cromatográficas                       | 29        |
| <b>7.</b>   | <b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>                     | <b>30</b> |
| <b>8.</b>   | <b>CONCLUSIONES</b>                               | <b>35</b> |
| <b>9.</b>   | <b>REFERENCIAS</b>                                | <b>36</b> |
| <b>10.</b>  | <b>ANEXOS</b>                                     | <b>37</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                              | Pág.      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Mecanismo de la metilación de un oligopéptido sintético.                    | <b>17</b> |
| <b>Figura 2.</b> Molécula de S-adenosilmetionina                                             | <b>17</b> |
| <b>Figura 3.</b> Molécula de S-adenosil-L-homocisteína.                                      | <b>17</b> |
| <b>Figura 4.</b> Plegamiento de la Enzima DDAH de la <i>Pseudomonas aureus</i> .             | <b>18</b> |
| <b>Figura 5.</b> Interacciones de una molécula de ADMA dentro del sitio activo de la enzima. | <b>19</b> |
| <b>Figura 6.</b> Proceso de eliminación de ADMA dentro de la enzima DDAH.                    | <b>20</b> |
| <b>Figura 7.</b> Regulación de los niveles intra y extracelulares de ADMA                    | <b>21</b> |
| <b>Figura 8.</b> Efectos de la presencia y ausencia del NO en el plasma sanguíneo.           | <b>22</b> |
| <b>Figura 9.</b> Molécula de Dimetilarginina asimétrica                                      | <b>23</b> |
| <b>Figura 10.</b> Reacción general entre OPA y aminas primarias.                             | <b>23</b> |
| <b>Figura 11.</b> Proceso de formación del aminoácido derivatizado.                          | <b>24</b> |
| <b>Figura 12.</b> Reacción de degradación del fluoróforo                                     | <b>24</b> |
| <b>Figura 13.</b> Cromatograma de un estándar 50 $\mu$ M en condiciones óptimas.             | <b>30</b> |
| <b>Figura 14.</b> Cromatograma con una composición de fase móvil 82:8 de BPP : ACN.          | <b>30</b> |
| <b>Figura 15.</b> Cromatograma de una repetición sin hacer lavado previo.                    | <b>31</b> |
| <b>Figura 16.</b> Espectro Infrarrojo recién preparado la solución                           | <b>39</b> |
| <b>Figura 17.</b> Espectro Infrarrojo 30 minutos después de la preparación (frio)            | <b>39</b> |
| <b>Figura 18.</b> Espectro Infrarrojo 30 minutos después de la preparación (ambiente)        | <b>39</b> |
| <b>Figura 19.</b> Curva de calibración para la cuantificación de ADMA.                       | <b>32</b> |
| <b>Figura 20.</b> Porcentaje de muertes en Colombia.                                         | <b>36</b> |
| <b>Figura 21 .</b> Cromatograma obtenido a una $\lambda$ =223 nm.                            | <b>36</b> |
| <b>Figura 22.</b> Cromatograma obtenido a una $\lambda$ =226 nm                              | <b>37</b> |
| <b>Figura 23.</b> Cromatograma obtenido a una $\lambda$ =230 nm                              | <b>37</b> |
| <b>Figura 24.</b> Cromatograma obtenido a una $\lambda$ =233 nm                              | <b>38</b> |
| <b>Figura 25.</b> Cromatograma obtenido a una $\lambda$ =236 nm                              | <b>38</b> |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                             | <b>Pág.</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Tabla 1.</b> Porcentaje de metilación del extremo N <sub>T</sub> al C <sub>T</sub> .     | <b>18</b>   |
| <b>Tabla 2.</b> Concentración de los estándares obtenidos mediante diluciones sucesivas     | <b>29</b>   |
| <b>Tabla 3.</b> Valores de absorbancia para la determinación de la $\lambda_{\text{max}}$ . | <b>31</b>   |

## LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

| <b>Abreviatura y/o acrónimo</b> | <b>Significado</b>                                          |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| ADMA                            | Dimetilarginian Asimétrica                                  |
| OPA                             | o-Ftalaldehido                                              |
| DDAH                            | Dimetilarginina diaminohidrolasas                           |
| PRMT                            | Proteína arginina metiltransferasa                          |
| CAT                             | Transportadores cationicos de aminoácidos                   |
| NO                              | Óxido Nitroco                                               |
| NOS                             | Óxido Nitrico Sintasa                                       |
| HPLC                            | Cromatografía liquida de alta resolución (siglas en inglés) |
| FLD                             | Detector de Fluorescencia                                   |
| BBP                             | Buffer Borato de Potasio                                    |
| BPP                             | Buffer fosfato de Potasio                                   |
| DNA                             | Ácido Desoxiribonucleico (siglas en inglés)                 |
| RGG                             | Tripéptido de Arginina-Glicina-Glicina                      |
| SDMA                            | Dimetilarginina Simétrica                                   |
| PTM                             | Modificación Postraducciona                                 |
| Adomet                          | S-Adenosilmetionina                                         |
| AdoHcy                          | S-Adenosil-L-metionina                                      |
| 3-MPA                           | Ácido 3-Mercaptopropionico                                  |
| Cys                             | Cisteína                                                    |
| His                             | Histidina                                                   |
| Glu                             | Glutamina                                                   |
| Leu                             | Leucina                                                     |
| Ile                             | Isoleucina                                                  |
| Arg                             | Arginina                                                    |
| Asp                             | Ácido Aspártico                                             |
| Phe                             | Fenilalanina                                                |

## 1. RESUMEN

La cuantificación de la dimetilarginina asimétrica mediante HPLC con detector de fluorescencia en plasma de mujeres gestantes y neonatos usando una derivatización precolumna con o-Ftalaldehído y realizando una purificación de la muestra mediante centrifugación en tubos amicon de 10 kDa, permitió desarrollar la estandarización de un método con un límite de cuantificación de 4,1  $\mu\text{M}$  y un límite de detección de 1,2  $\mu\text{M}$ ; adicionalmente, se llevó a cabo una cadena de frío para garantizar la repetitividad de los análisis y la estabilidad del agente derivatizante.

El proceso de separación y detección se optimizó realizando un lavado de 20 minutos utilizando agua y acetonitrilo después de cada repetición, logrando la detección y cuantificación del 65% de las muestras de las mujeres gestantes y el 45% de las muestras de los neonatos con un coeficiente de variación del 4.2%.

El valor tan bajo del coeficiente de variación permite deducir que el método en cuestión es factible, tanto así que al realizar un análisis de correlación entre los datos, se observó que a pesar de que los datos del grupo de las madres presentó una distribución anormal, posee un coeficiente de Pearson de 0.69 lo cual indica que hay una relación directa, sin embargo, el coeficiente de Spearman arroja un valor de 0.57, permitiendo inferir que los datos presentan una tendencia favorable, sin embargo, se debe aumentar el número de datos para observar una mejor correlación entre ellos.

## 2. INTRODUCCIÓN

La arginina es un aminoácido muy importante a nivel biológico, principalmente por su capacidad para interaccionar con otras moléculas debido a que posee cinco átomos con capacidad para realizar enlaces de hidrógeno; una de estas funciones importantes se evidencia en los complejos DNA-proteína donde estas interacciones permiten una estabilización del DNA<sup>1</sup>.

El grupo guanidino de la arginina es un sustrato específico de la proteína metiltransferasa tipo 1 (PRMT1), enzima cuya actividad catalítica se basa en la dimetilación de este grupo presente en la cadena lateral de la arginina; estas enzimas poseen una especificidad muy alta, ya que se ha observado experimentalmente que las secuencias RGG en proteínas son los objetivos de las PRMT1 para realizar la dimetilación, adicionalmente este proceso se encuentra altamente regulado, ya que la reacción empieza con una monometilación desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal<sup>2,3</sup>.

Yoshimatsu, M. y col. (2011), investigaron el posible rol de las PRMTs en la carcinogénesis humana, adicionalmente evaluaron los niveles de ADMA en estos pacientes y encontraron que sus niveles se incrementan al aumentar la expresión de PRMT1 y PRMT6, por lo cual, concluyen que existe una relación entre la sobreexpresión de las enzimas así como el aumento en los niveles de ADMA en carcinogénesis humana, haciendo del ADMA una biomolécula cada día más importante como posible marcador en diferentes enfermedades<sup>4</sup>.

La dimetilarginina asimétrica (ADMA), es una biomolécula que se encuentra relacionada en la regulación de la enzima Óxido nítrico sintasa (eNOS), debido a que esta molécula es un inhibidor competitivo de dicha enzima afectando los niveles de Óxido nítrico (NO) en el plasma sanguíneo; estudios recientes demuestran que el ADMA se encuentra muy relacionada con enfermedades del sistema cardiovascular y se ha justificado con el aumento en los niveles celulares de este aminoácido dimetilado, ya que al disminuirse la concentración de NO, el endotelio sufre cambios y genera una deficiencia en la vasodilatación<sup>5</sup>.

El ADMA es eliminada del organismo mediante los riñones donde cerca del 20% del ADMA sintetizado es liberado por la orina, y cerca del 80% es degradada por la acción de la  $N^G, N^G$ -Dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAH). La DDAH es una enzima cuyos sustratos son la monometilarginina (MMA) y el ADMA, los cuales son transformados en monometilamina y dimetilamina respectivamente, además de estos productos hay un subproducto de L-citrulina, la cual es utilizada en la biosíntesis de la arginina.

El ADMA es transportado al interior y al exterior de la célula por los transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT), los cuales se clasifican en tres; CAT-1, CAT-2A y CAT-2B, donde el CAT-2B es el encargado específicamente del equilibrio en los niveles de ADMA, SDMA y MMA en el interior y exterior de la célula. Los CATs son los encargados de mantener los niveles plasmáticos adecuados de aminoácidos dibásicos<sup>6</sup>.

La determinación de ADMA se ha vuelto un tema de interés en la actualidad, siendo la técnica del HPLC una forma eficaz y precisa para hacerlo; una de las técnicas implementadas ha sido la derivatización con o-phtalaldehído (OPA), ya que este agente derivatizante es específico para aminas primarias, lo cual hace que se logren bajos límites de detección y con una baja interferencia de otros subproductos<sup>7</sup>.

Adicionalmente, el OPA es muy estable con un tiempo de vida media aproximado de nueve días bajo refrigeración a 3 °C, permitiendo un trabajo versátil y una menor utilización de reactivo; la derivatización consiste en la reacción en medio básico entre el agente derivatizante, un grupo tiol y el compuesto de interés, lo cual genera 1-(alquiltiol)-2-alquilisoindoles, compuestos altamente fluorescentes que permiten una fácil detección mediante HPLC con detector de fluorescencia<sup>8,9</sup>.

El ADMA cada día se ha ido convirtiendo en un posible marcador biológico ya que el aumento en los niveles del mismo ha sido relacionado con una variedad de enfermedades tanto del sistema cardiovascular así como diferentes tipos de cáncer en humanos, por lo tanto, su estudio y más aun el lograr un vía de detección rápida y simple son estudios que deben ser prioridad en el mundo, por eso la finalidad de este documento es exponer una vía de detección usando una derivatización pre-columna mediante HPLC sin el uso de procedimientos costoso y con un buen límite de detección.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Determinar los niveles plasmáticos de Dimetilarginina Asimétrica en mujeres gestantes y sus neonatos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Estandarizar las condiciones necesarias para la determinación de los niveles plasmáticos de ADMA en mujeres gestantes y sus neonatos.
- ✓ Cuantificar ADMA en plasma de mujeres gestantes y en plasma de cordón umbilical.
- ✓ Evaluar la correlación entre los niveles plasmáticos de ADMA en las mujeres gestantes y los niveles en cordón umbilical.

## 4. MARCO TEÓRICO

Recientemente, se ha evidenciado que los grupos metilo al igual que los grupos fosfato, son elementos de control de la función de las proteínas, y que los residuos de arginina constituyen uno de los principales blancos para la metilación en células de mamíferos. Este aminoácido contiene cinco átomos posibles de interacción con aceptores biológicos de enlaces de hidrógeno en la célula y se ha observado que en los complejos DNA-proteína, los residuos de arginina son los más accesibles para la interacción intermolecular mediante enlaces de hidrógeno, tanto así, que dichos residuos permiten estabilizar la estructura del complejo ADN-proteína; por lo tanto, una metilación de un residuo de arginina no solo influye en un cambio en la estructura de la proteína debido al aumento de la afinidad con anillos aromáticos de otros residuos de aminoácidos, sino que también genera la pérdida de un potencial donante de enlaces de hidrógeno, generando una disminución en la afinidad de unión con biomoléculas que requieren una estabilidad determinada afectando funciones biológicas del organismo<sup>1</sup>.

### 4.1. Dimetilarginina Asimétrica (ADMA)

El ADMA es una biomolécula resultante de la dimetilación del grupo guanidino de los residuos de arginina presentes en las proteínas, este compuesto fue aislado en el año 1987, cuando se descubrió que el organismo produce L-citrulina y dimetilamina como productos de su degradación enzimática mediante las  $N^G$ ,  $N^G$ -Dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAH)<sup>10</sup>.

Los niveles de ADMA en plasma de humanos saludables se encuentran en el rango de 0.35 – 0.70  $\mu\text{mol/L}$ , estos niveles pueden ser regulados por el riñón, que ayuda a la eliminación de ADMA via DDAH y por excreción por la orina. Se ha estimado que los humanos generan aproximadamente 300 moles de ADMA/ día, de los cuales más del 80% es metabolizado por la DDAH y el 20% es eliminado mediante la orina, el incremento en la producción de ADMA puede ser causado tanto por la sobrerregulación de las PRMTs como por la actividad proteolítica.

Ciertos residuos de arginina en las proteínas sufren dimetilación asimétrica por una isoforma de las proteínas arginina metiltransferasas (PRMTs) tipo 1; Después de la hidrólisis de estas proteínas metiladas, el ADMA es liberado dentro de las células donde cumple su función como inhibidor de la óxido nítrico sintasa (eNOS). Por consiguiente las actividades de las PRMTs, DDAH y los transportadores catiónicos de aminoácidos (CAT) asumen un papel crítico en la determinación de los niveles celulares de ADMA y por lo tanto, el estado de activación o inhibición de la eNOS en los tejidos<sup>6</sup>.

#### **4.2. Proteína arginina metiltransferasa (PRMT)**

Las PRMTs participan en la regulación de muchos procesos biológicos. Entre las actividades que ejercen, un control muy preciso se encuentra el reconocimiento de grupos arginil específicos en las proteínas y de un grado de metilación determinado, estos procesos aun no son de un completo entendimiento hasta la actualidad, sin embargo, se conoce que las PRMT1 poseen la capacidad para realizar tanto mono- como dimetilación de los grupos arginil en las proteínas.

Este proceso de metilación se ha observado según estudios recientes en la regulación postraducciona (PTM) en células eucariotas, y se sabe que es catalizada por las PRMTs de las cuales existen nueve isoformas que cumplen una función específica, por ejemplo, las PRMT1 solo permiten la generación de monometilarginina (MMA) y dimetilarginina asimétrica, mientras que la PRMT2 se relaciona principalmente con la producción de Dimetilarginina simétrica (SDMA); las otras isoformas se encuentran relacionadas en otros procesos biológicos que están siendo estudiados actualmente<sup>11</sup>.

Cada una de las argininas metiladas (MMA, ADMA o SDMA) puede inducir diferentes respuestas biológicas en la célula. Por lo tanto, un control en el tipo de metilación, en la cantidad de residuos de arginina metilados (esto debido a que muchas proteínas contienen múltiples argininas que son metiladas en diferentes patrones) y en el tipo de proteínas que son metiladas son factores requeridos para el correcto funcionamiento de las células. De hecho se ha observado que la eliminación de las PRMT1 en ratones es letal y que la

desregulación en la metilación de las argininas ha sido asociada con patologías del corazón, riñón, pulmón e inclusive con cáncer<sup>4,12</sup>.

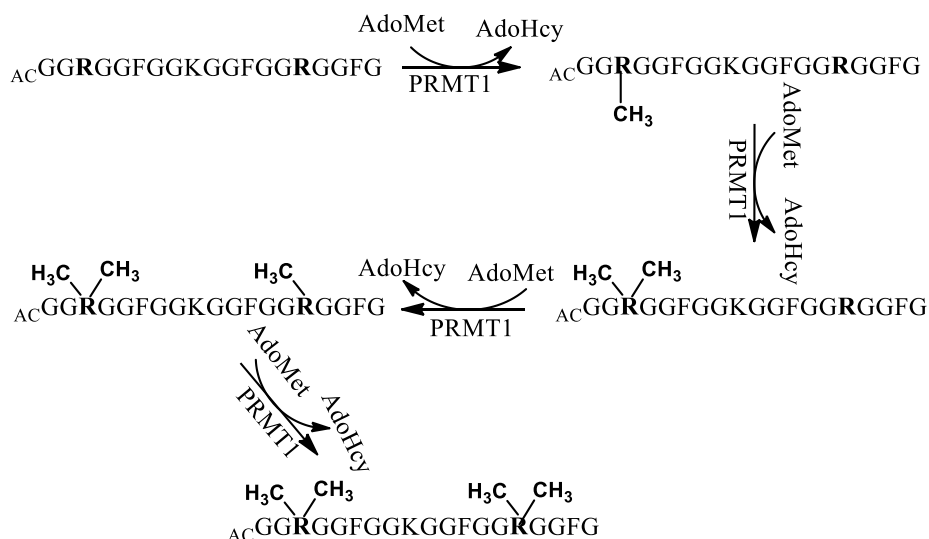
*Yoshimatsu, M.* y col. en el año 2011, investigaron el posible papel de las PRMTs en la carcinogénesis humana, mediante el estudio de los perfiles de la expresión de todas las isoformas de las PRMTs en los tejidos y encontraron subregulación de los niveles de expresión de las PRMT1 y PRMT6 en los tejidos cancerosos al comparar con tejidos normales. Adicionalmente evaluaron los niveles de ADMA en estos pacientes y encontraron que sus niveles se incrementan al aumentar la expresión de PRMT1 y PRMT6, por lo cual, concluyen que existe relación entre la sobreexpresión de las enzimas así como el aumento en los niveles de ADMA en carcinogénesis humana, lo cual sugiere que ADMA cada día puede ser más importante como posible marcador en diferentes enfermedades<sup>4</sup>.

*Shanying, G.* y col. (2012) en un estudio utilizando espectrometría de masas y análisis mediante HPLC, concluyeron que la metilación llevada a cabo por la PRMT1 a sustratos ricos en arginina no es un proceso aleatorio, por el contrario, posee una preferencia por el extremo N-terminal (N<sub>T</sub>) de un 55% , un 39% en argininas intermedias y un 6% en el extremo C-terminal (C<sub>T</sub>). Adicionalmente, observaron que las regiones de metilación del DNA son abundantes en secuencias ricas en las regiones repetitivas de RGG; la tabla 1 permite observar los resultados obtenidos por *Shanying, G.* y col. , en el cual reportan un Porcentaje de error menor al 5%<sup>4</sup>.

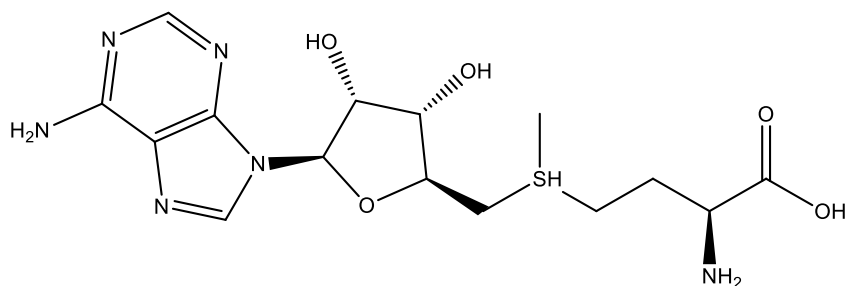
**Tabla 1.** Porcentaje de metilación del extremo N<sub>T</sub> al C<sub>T</sub>.

| Péptido             | Secuencia del péptido | % porcentaje de la primera metilación |          |                   |
|---------------------|-----------------------|---------------------------------------|----------|-------------------|
|                     |                       | N <sub>T</sub> -R                     | Centro R | C <sub>T</sub> -R |
| R2                  | GGRGGFGGKGGFGGRGGFG   | 100                                   | -        | 0                 |
| RKR-CH <sub>3</sub> | GGRGGFGGKGGFGGR*GGFG  | 87                                    | -        | 13                |
| R3                  | GGRGGFGGRGGFGGRGGFG   | 55                                    | 39       | 6                 |

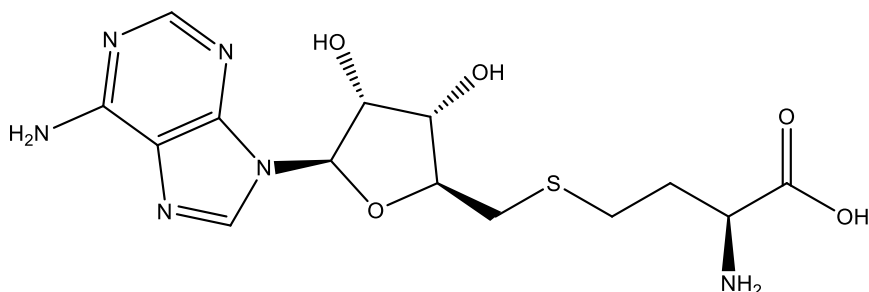
El mecanismo presentado en la figura 1 permite observar el proceso de metilación de los residuos de arginina en un oligopéptido, usando la S-adenosilmetionina (Adomet, figura 2), el cual es un co-sustrato típico en la transferencia de grupos metilo, y obteniendo como subproducto la S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy, figura 3)<sup>2</sup>.



**figura 1.** Mecanismo de la metilación de un oligopéptido sintético.



**Figura 2.** Molécula de S-adenosilmetionina.



**Figura 3.** Molécula de S-adenosil-L-homocisteína.

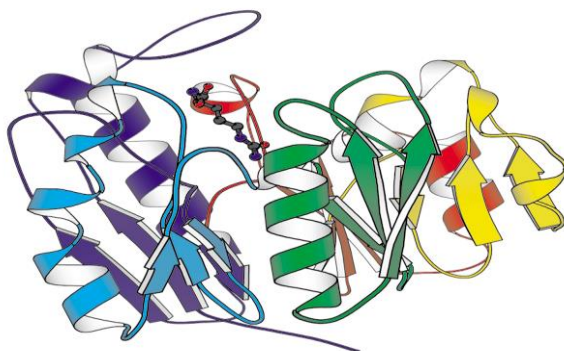
Osborne, T. y col., mostraron que los residuos cargados positivamente deben estar distanciados entre 11 a 14 aminoácidos de un punto de metilación a otro para obtener una mayor eficiencia catalítica y de unión de la PRMT1. Lo cual permite entender cada vez más que el proceso de metilación es altamente regulado y requiere un control muy preciso<sup>13</sup>.

#### 4.3. DDAH Y CAT

La ruta principal de eliminación de ADMA y MMA es catabólica (proceso mediante el cual se transforman biomoléculas complejas en moléculas más sencillas), proceso enzimático de la enzima DDAH (EC 3.5.3.18), donde se generan subproductos como la L-citrulina y di o monometilamina. Cuando la DDAH es inhibida, la actividad catalítica de la NOS disminuye porque hay un incremento intracelular de la concentración de ADMA; esto ha hecho que recientemente la DDAH sea un objetivo novedoso para el diseño de agentes terapéuticos para modular la generación de NO, así como su relación con diferentes enfermedades debido a cambios en la síntesis de NO<sup>14</sup>.

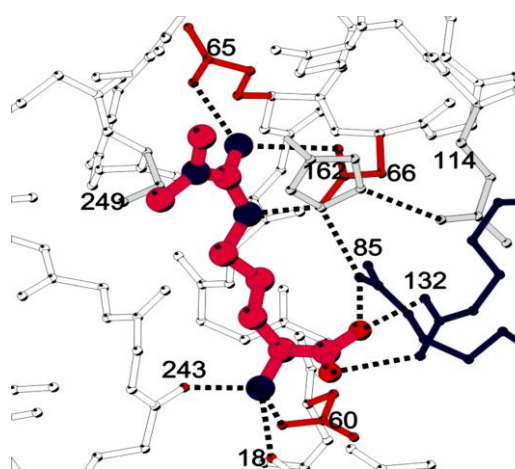
Estudios de la DDAH en *Pseudomonas aureus*, permitio observar el plegamiento de esta enzima, la cual es como un cilindro formado por cinco módulos, cada uno basado en una estructura  $\beta\beta\alpha\beta$  que encierra el sitio activo de la DDAH, la figura 4 permite observar esta configuración.

La DDAH cataliza reacciones en las cuales el grupo guanidino de la arginina es transferido a una segunda molécula sustrato, esto se lleva a cabo gracias a los residuos de Cys 249, His 162 y Glu 114 (triada catalítica) presentes en el sitio activo<sup>14</sup>.



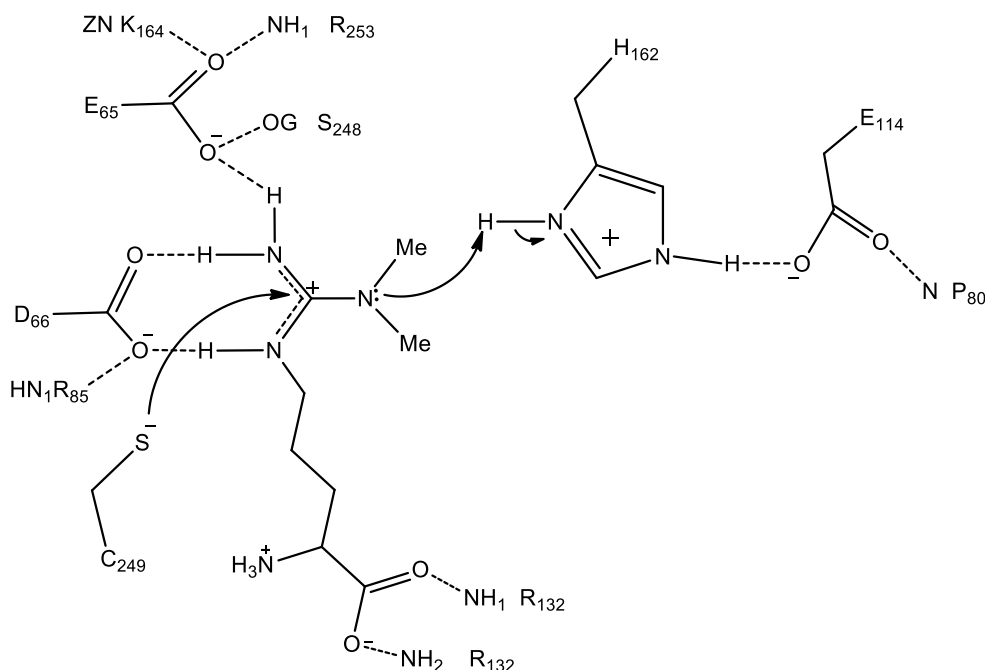
**Figura 4.** Plegamiento de la Enzima DDAH de la *Pseudomonas aureus*.

Dentro del sitio activo, una red de enlaces de hidrógeno permite el anclaje del sustrato ADMA junto con los residuos de la triada catalítica; el ADMA forma enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno de la cadena principal de la Leu 18 y la Ile 243 y con las cadenas laterales de Arg 132, Arg 85 y Asp 60. La parte hidrofóbica de la cadena del ADMA, es protegida de los residuos cargados en el sitio activo por las cadenas de Phe 63 y Leu 161 de la DDAH, el grupo guanidinio del ADMA está unido mediante enlaces de hidrógeno con la Asp 66 y Glu 65. La figura 5 permite observar las interacciones descritas anteriormente<sup>3,14</sup>.



**Figura 5.** Interacciones de una molécula de ADMA dentro del sitio activo de la enzima.

*Murray-Rust, J.* y col. en un estudio realizado en el 2001, propusieron un mecanismo en el cual se involucra un ataque nucleófilico por el átomo de azufre de la Cys 249 sobre el átomo de carbono del grupo guanidino de la Dimetilarginina, formando un centro tetraédrico, posteriormente se lleva a cabo una hidrólisis del intermediario liberando la citrulina unida al sitio activo mientras que la dimetilamina se difunde. La liberación del producto presuntamente requiere un cambio conformacional de la enzima, que va desde un cierre hasta una apertura de la misma. Sin embargo, esto no ha sido definido debido a que no se ha logrado aislar una estructura intermediaria, por lo tanto, debido a la similitud del proceso catalítico de la DDAH con la amidinotransferasas, se considera la hipótesis de dicho cambio conformacional; la figura 6 da una visión de lo descrito anteriormente; posterior a la liberación, se da la respectiva eliminación vía renal<sup>14</sup>.



**Figura 6.** Proceso de eliminación de ADMA dentro de la enzima DDAH<sup>14</sup>.

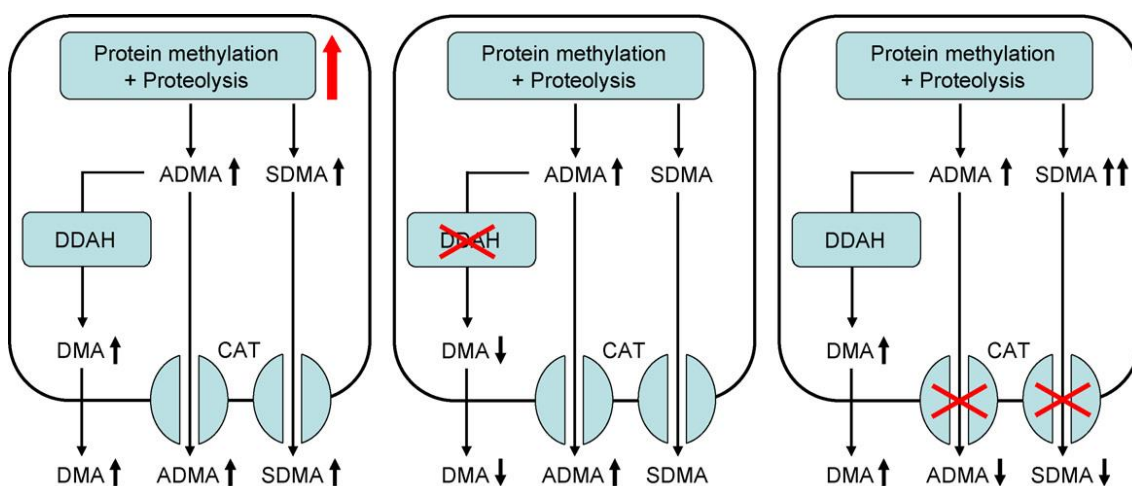
El transporte de ADMA al interior o al exterior de la célula, está determinado por los CATs; estos transportadores se han clasificado en tres clases (CAT-1, CAT-2B y CAT-2A) según el tipo de aminoácidos que son transportados; por ejemplo, aminoácidos dibásicos como la arginina, lisina, y la ornitina que tienen una carga neta positiva a pH neutro son transportados por CAT-1 y CAT-2B. Closs, E. y col., demostraron que la MMA, ADMA y SDMA son buenos sustratos para la CAT-2B en los humanos. Cabe resaltar que los CATs son los principales responsables de mantener el equilibrio de los aminoácidos dibásicos entre la célula y el plasma<sup>15</sup>.

Li-Tung Huang y col. concluyeron que la actividad de la DDAH fue la responsable de la eliminación del 80% del ADMA, ilustrando la importancia de esta enzima en el metabolismo de la dimetilarginina, sin embargo, recalcan que la actividad de las PRMTs, la proteólisis y el intercambio intra y extracelular mediado por los CATs juegan un papel muy importante en la eliminación del ADMA<sup>16</sup>.

Un incremento en la generación de ADMA, es causado tanto por una sobreexpresión de los PRMTs así como por el aumento de la actividad proteolítica, aumentando los niveles intracelulares. Asumiendo que el sistema

de CATs no está saturado, los niveles incrementados de ADMA intracelular serán exportados, aumentando de este modo el ADMA extracelular. Así mismo una disminución de la velocidad en la eliminación de ADMA incrementara los niveles intracelulares de ADMA en la célula, sin embargo, los efectos sobre el ADMA extracelular dependeran tanto de la disminución de la actividad de la DDAH asi como de actividad de los CATs.

Al disminuir la expresión o inhibir la actividad de la DDAH, se incrementarán los niveles intra y extracelulares de ADMA; Por el contrario, al bajar la actividad de los CATs la salida de ADMA se disminuye incrementando los niveles intracelulares y disminuyendo los extracelulares. La figura 7 permite ver un resumen detallado de los cambios en los niveles intra y extracelular según la regulación de los CATs, PRMTs y DDAH<sup>6</sup>.



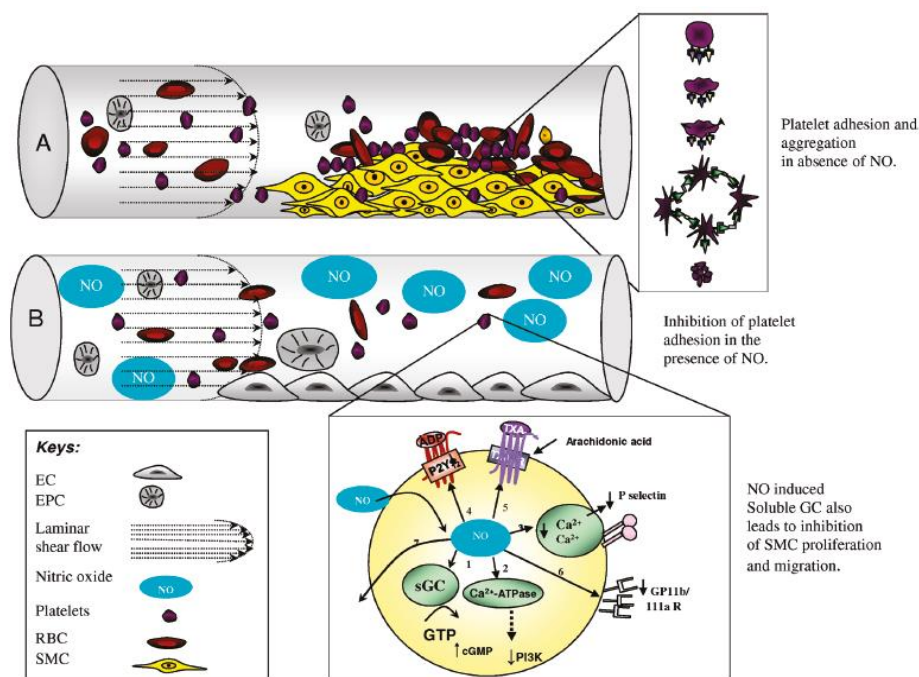
**Figura 7.** Regulación de los niveles intra y extracelulares de ADMA.

#### 4.4. Óxido Nítrico

El NO es un radical libre estable no polar, el cual fue descubierto por Joseph Priestly en el siglo 18, este compuesto posee un electrón desapareado en un orbital molecular  $\pi^*$ , lo cual le confiere gran afinidad por moléculas con pares de electrones solitarios y con orbitales  $d_{\pi}$  de metales de transición como el Hierro; únicamente hasta el año 1980 se descubrió la función del NO en los procesos de vasodilatación del organismo, abriendo un amplio campo de investigación; es tan importante su regulación que la producción de trombos

está altamente ligado con su concentración en la sangre, la figura 8 permite observar los efectos de la ausencia o presencia del NO.

Vale la pena destacar el papel del endotelio como: secretor de óxido NO, responsable de la acción antiagregante plaquetaria, produce prostaciclina antiagregantes, y una acción fibrinolítica relacionada con la síntesis y secreción del activador del plasminógeno tisular (es una glucoproteína sintetizada por el hígado, presente en el plasma sanguíneo y la mayor parte del fluido extracelular). El endotelio normalmente proporciona una superficie no trombogénica, ya que contiene, por ejemplo, sulfato de heparán que actúa como un cofactor para la activación de la antitrombina, una proteasa que inactiva varios factores en la cascada de coagulación, ayuda en la formación de nuevos vasos sanguíneos, se involucra en la vasoconstricción, la vasodilatación y por lo tanto en el control de la presión arterial.<sup>5</sup>

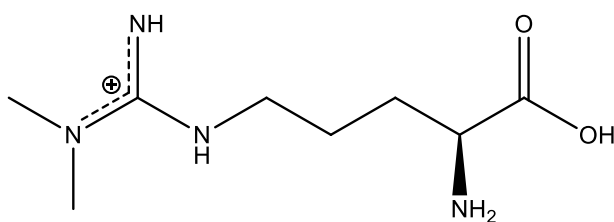


**Figura 8.** Efectos de la presencia y ausencia del NO en el plasma sanguíneo.

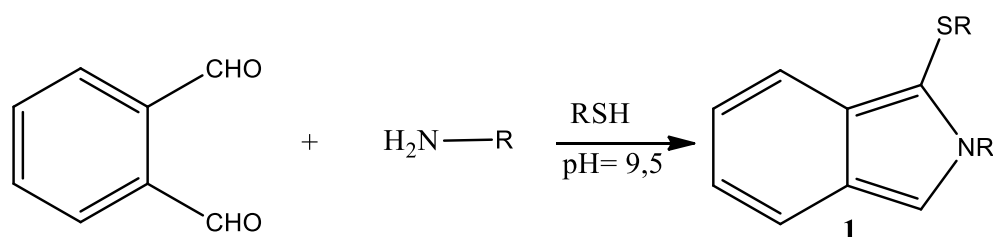
\*EC: Células endoteliales EPC: células progenitora endotelial, RBC: Células sanguíneas rojas  
SMC: Células musculares lisas.

#### 4.5. Derivatización

ADMA como se observa en la figura 9, presenta un grupo amino primario, este grupo permite realizar un proceso de derivatización muy efectivo utilizando o-Phtalaldialdehído (OPA) como agente derivatizante, debido a que este compuesto posee dos características fundamentales, la primera es que posee un tiempo de vida media de aproximadamente nueve días en las condiciones que fue preparado (advancement) y además reacciona de una manera muy específica con aminas primarias en presencia de tioles para formar derivados de 1-(alquiltiol)-2-alquilisoindoles **1**, así como se observa en la figura 10<sup>16</sup>.



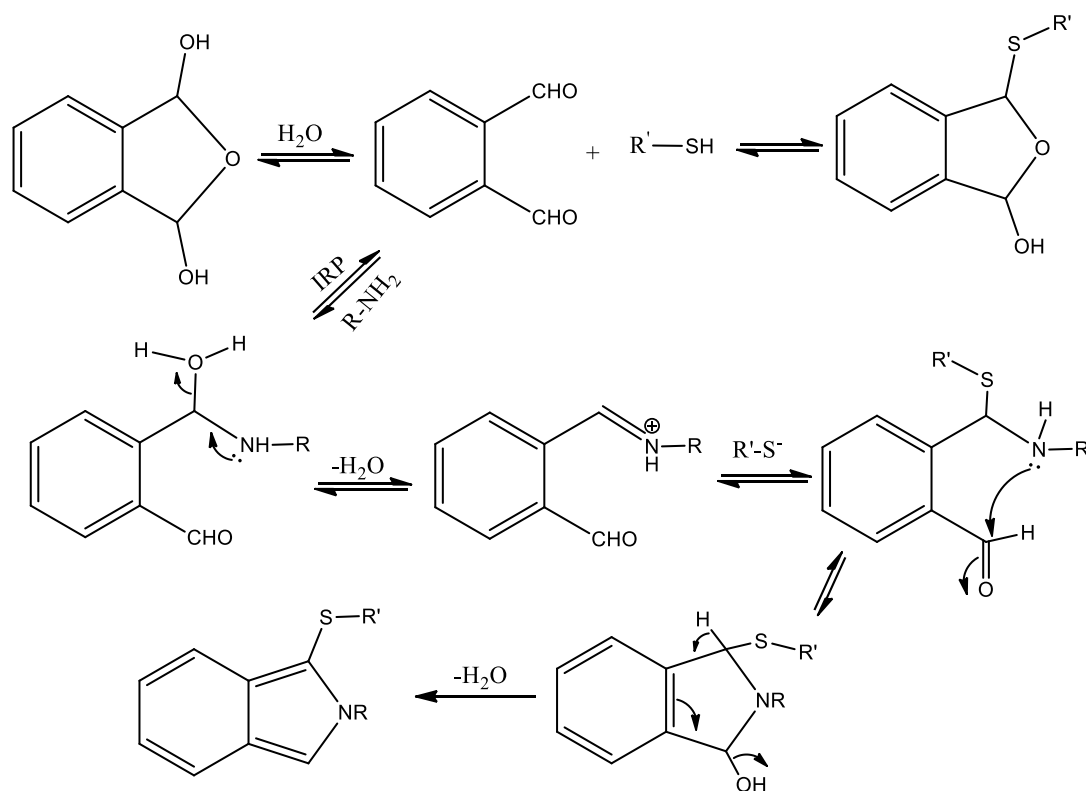
**Figura 9.** Molécula de Dimetilarginina asimétrica.



**Figura 10.** Reacción general entre OPA y aminas primarias. (R= alquilo).

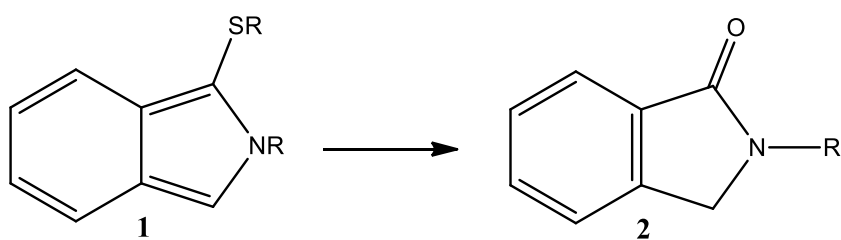
El mecanismo por el cual se lleva a cabo el proceso de derivatización aún no es claro, sin embargo, *García Alvarez-coque* y col. presentan un mecanismo propuesto<sup>12</sup> en el cual, se tienen en cuenta dos equilibrios iniciales, uno debido a la hidratación del OPA y otro a la reacción reversible con el grupo tiol; el mecanismo propone que la amina realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo acilo para formar una carbinolamina, la cual se deshidrata para formar una imina protonada altamente reactiva, esta es rápidamente atacada por el anión tiol para formar un  $\alpha$ -alquilaminobenzilsulfuro, el cual posteriormente lleva a

cabo un ataque nucleofílico intramolecular de la amina secundaria sobre el grupo carbonilo presente en el OPA par forma el anillo isoindólico, el cual sufre una deshidratación formando el producto de interés (ver Figura 11)<sup>16,17</sup>.



**Figura 11.** Proceso de formación del aminoácido derivatizado.

El compuesto generado es altamente fluorescente, y permite la detección mediante HPLC de niveles bajos de aminas primarias; sin embargo, *Kehr, J.* en 1993 reportó una degradación posterior (figura 12) donde su estabilidad era proporcionado por la naturaleza de la amina, el exceso de OPA y más importante la naturaleza del tiol utilizado; el mecanismo no ha sido reportado hasta el momento<sup>18</sup>.



**Figura 12.** Reacción de degradación del fluoróforo. (R= Alquilo).

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud reporta una mortalidad materna aproximadamente de 210 muertes por cada 100.000 nacidos vivos a nivel mundial, esto equivale a 289 mil muertes reportadas en el año 2013, siendo Europa, Asia y África los continentes con un mayor índice de mortalidad. El último informe de las enfermedades no transmisibles del año 2014, reporta que un estimado de 202 mil muertes anuales, el 28% de muertes es debido a enfermedades cardiovasculares y el 12% está relacionado con las condiciones nutricionales y la mortalidad materna, es decir, un promedio de 24 mil muertes anuales se presentan en Colombia por casos relacionados con el embarazo (ver anexo N° 1)<sup>19,20</sup>.

Estudios realizados en el 2009 por Böger, Rainer<sup>21</sup> y col., encontraron que los niveles sanguíneos de la Dimetilarginina Asimétrica (ADMA) en los seres humanos, se asocian de manera positiva con patologías como la diabetes *mellitus* y problemas cardiovasculares como la aterosclerosis principalmente. Adicionalmente, estudios de Speer, paul<sup>22</sup> en el 2008 concluyen que altos niveles de ADMA en las gestantes, favorecen el desarrollo de hipertensión y de pre-eclampsia en el embarazo al participar en la generación de estados de disfunción endotelial. Teniendo en cuenta que investigaciones en los últimos años han demostrado que el ambiente intrauterino tiene una influencia importante en la salud del individuo a lo largo de su vida, el estudio de los niveles de ADMA en plasma de mujeres gestantes y en plasma de cordón, puede ser un paso inicial en el conocimiento y desarrollo de biomarcadores tempranos de patologías relacionadas con disfunción endotelial, tanto en la salud materna como la salud neonatal a corto y/o largo plazo, adicionalmente, encontrar un método económico y rápido permite un análisis eficaz al momento de cuantificar la cantidad de ADMA presente.

## 6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

El análisis cromatográfico se realizó mediante HPLC marca Agilent 1260 Infinity con detector de FLD. La estandarización de la cuantificación de ADMA en plasma se basó en las técnicas descritas por *Teerlink, T* y col. en el 2002 y *Blackwell, S* y col. en el 2009<sup>8,23</sup>.

### 6.1. Materiales

Los reactivos usados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Merck y Mallinckrodt, estos no tuvieron una purificación adicional al momento de realizar cada una de las respectivas soluciones. Se utilizó la balanza analítica 100/X para el pesado de cada uno de los reactivos usados.

### 6.2. Preparación de Buffer Borato de Potasio (200mM)

Se disolvieron 371 mg de  $H_3BO_3$  y 447,3 mg de KCl en agua desionizada y se enrasó a 30 mL, posteriormente se le adicionó NaOH 50 mM hasta obtener un pH=9.5, este pH se determinó mediante un pHmetro Thermo Scientific TS625.

### 6.3. Preparación de Buffer Fosfato de Potasio (50mM)

Se pesaron 2,647 g de  $K_2HPO_4$  y 4,736 g de  $KH_2PO_4$  y se disolvieron en un litro de agua desionizada, se obtuvo pH=6.5; este buffer se filtró utilizando una membrana de celulosa estéril con un tamaño de poro de 0.22  $\mu m$ , con el fin de remover impurezas que pudiesen interferir en el análisis cromatográfico debido a que este buffer es utilizado como fase móvil en la determinación de ADMA.

### 6.4. Solución de derivatización

Se preparó una solución en la cual se adicionaron 450  $\mu L$  de BBP, 50  $\mu L$  de Metanol, 2,5  $\mu L$  de 3-MPA y 2,5 mg de OPA. La mezcla se sometió en un agitador Thermolyne –Barnstead por treinta segundos con el fin de homogeneizala; posteriormente se disolvieron 303  $\mu L$  de la solución inicial en 1197  $\mu L$  de BBP, obteniendose una concentración de OPA y de 3-MPA de 7,5 mM y de 11,5 mM respectivamente.

### 6.5. Preparación de los estándares

Se prepararon 1000  $\mu\text{L}$  de ADMA 1mM y se realizaron diluciones sucesivas usando HCl 10 mM como disolvente, se obtuvieron 11 estándares como se observa en la tabla 2.

**Tabla 2.** Concentración de los estándares obtenidos mediante diluciones sucesivas.

| Puntos | Concentración ( $\mu\text{M}$ ) |
|--------|---------------------------------|
| 1      | 100.0                           |
| 2      | 50.00                           |
| 3      | 25.00                           |
| 4      | 12.50                           |
| 5      | 6.250                           |
| 6      | 3.125                           |
| 7      | 1.562                           |
| 8      | 0.781                           |
| 9      | 0.391                           |
| 10     | 0.195                           |
| 11     | 0.097                           |

Cada uno de los estándares se centrifugó a 14000 rpm y 4°C en tubos Amicon ultra de 10 kDa (centrifuga Hetitich Zentrifugen); adicionalmente se realizó una segunda curva de calibración usando plasma como disolvente en lugar de HCl y mediante diluciones sucesivas se obtuvieron las mismas concentraciones presentadas en la Tabla 1, los estándares se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su análisis mediante HPLC.

### 6.6. Preparación y derivatización de las muestras

Cada una de las muestras utilizadas se encontraban almacenadas a -70°C, por lo tanto, estas fueron descongeladas y centrifugadas en tubos Amicon, y se obtuvieron alícuotas de 150  $\mu\text{L}$  de cada una; estas muestras se almacenaron a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

La derivatización se llevó a cabo en viales Agilent de 250  $\mu\text{L}$  con pies de soporte polimérico los cuales fueron introducidos en viales Agilent de 1500  $\mu\text{L}$ . la relación entre OPA y muestra fue de 2:1, usando 60  $\mu\text{L}$  de OPA por cada 30  $\mu\text{L}$  de estándar o muestra.

### **6.7. Condiciones Cromatográficas**

Se utilizó una columna  $\text{C}_{18}$  Zorbax de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 15 cm de largo; las fases móviles utilizadas fueron BPP (Fase móvil A) y ACN (Fase móvil B), este último fue previamente filtrado utilizando una membrana de Nylon Whatman de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro; se manejó una relación entre las fases móviles de 91,5: 8,5 respectivamente.

El proceso de cuantificación se llevó a cabo isocráticamente a un flujo de 0.700 mL/min, con un tiempo de corrida de 20 min, y a los 18 min se observa el pico de interés, este compuesto se detectó usando una longitud de onda de excitación y emisión de 230 y 460 nm respectivamente.

Después de cada medición se realiza un lavado usando  $\text{H}_2\text{O}$  (Fase móvil C) y ACN por veinte minutos, y un gradiente el cual consiste en un tiempo de tres minutos para el paso de 91,5:8,5 de las fases móviles A y B respectivamente a 50:50 de Agua-Acetonitrilo, en donde en esta última composición se deja por 9 min; posteriormente durante un tiempo de 3 min se genera el cambio de composición de fase móvil hasta obtener un 100% de Agua realizando un lavado por 2 min adicionales. La parte final del gradiente finaliza con el regreso a las condiciones iniciales en la composición de las fases móviles A y B para dar inicio al próximo análisis.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**7.1. OBJETIVO 1.** Estandarizar una metodología para la determinación de los niveles plasmáticos de ADMA mediante HPLC.

### 7.1.1. Selección de una longitud de onda de excitación y emisión máxima

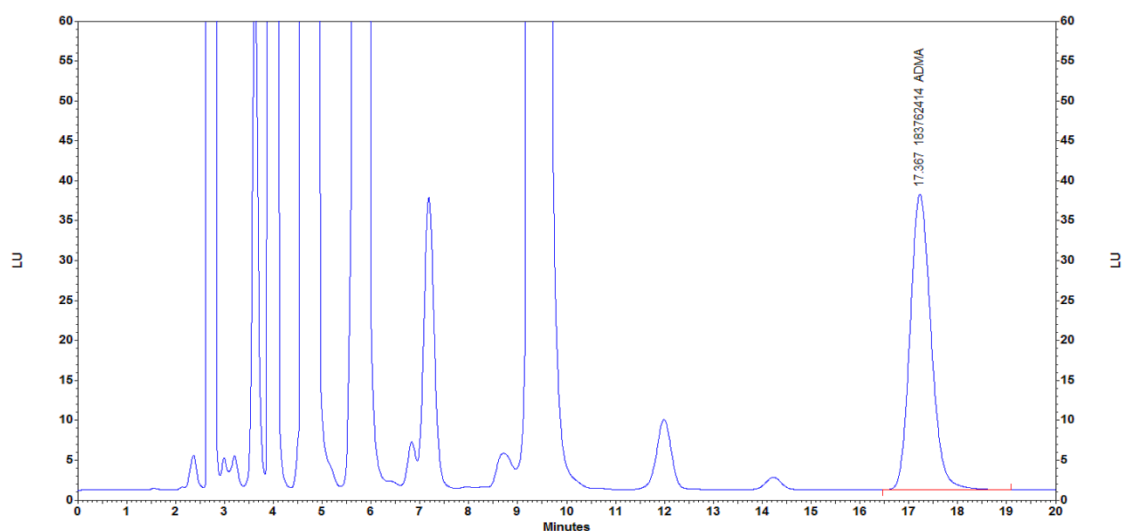
El análisis mediante ultravioleta presenta un rango de longitudes de onda de excitación entre 223 y 236 nm, de las cuales como se observa en la grafica 1, la máxima absorción por parte del derivado se da a una longitud de onda igual a 230 nm; al mismo tiempo la muestra se hizo pasar por el detector de fluorescencia obteniendose una longitud de onda de emisión maxima a 460 nm. La tabla 3 presenta los valores de en el rango mencionado anteriormente (los gráficos se presentan en el anexo 2).

**Tabla 3.** Valores de absorbancia para la determinación de la  $\lambda_{\max}$ .

| Longitud de onda (nm) | Absorbancia (mUA) |
|-----------------------|-------------------|
| 223                   | 38                |
| 227                   | 43                |
| 230                   | 46                |
| 233                   | 44                |
| 236                   | 38                |

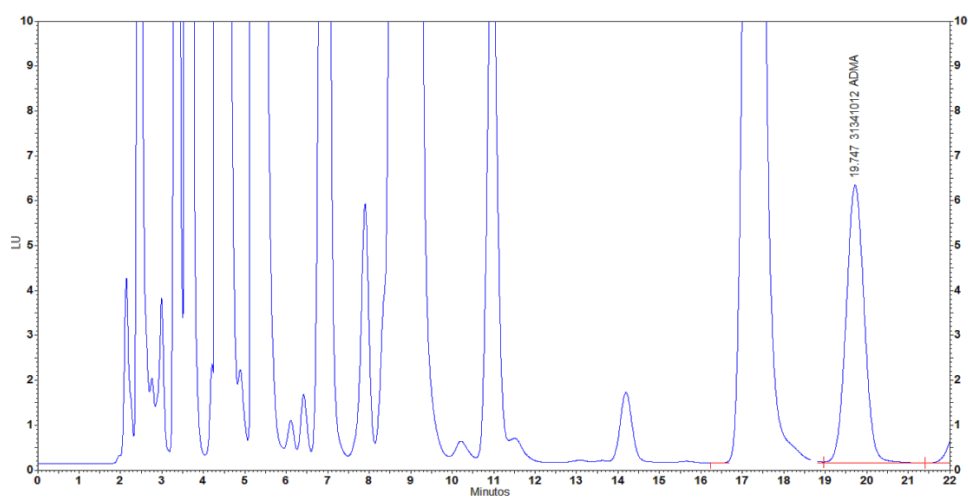
### 7.1.2. Proporción de la fase móvil y lavado

Al realizar pruebas con diferentes composiciones de fase móvil, utilizando Buffer Fosfato de Potasio y Acetonitrilo, la composición de 91,5:8,5 y un flujo de 0.700 mL/min permite una buena resolución de los picos y un tiempo de corrida menor, ya que con composiciones diferentes se requiere de un tiempo mayor y una resolución mucho menor; la figura 13 permite observar el cromatograma de un estándar de una concentración de 50  $\mu$ M.

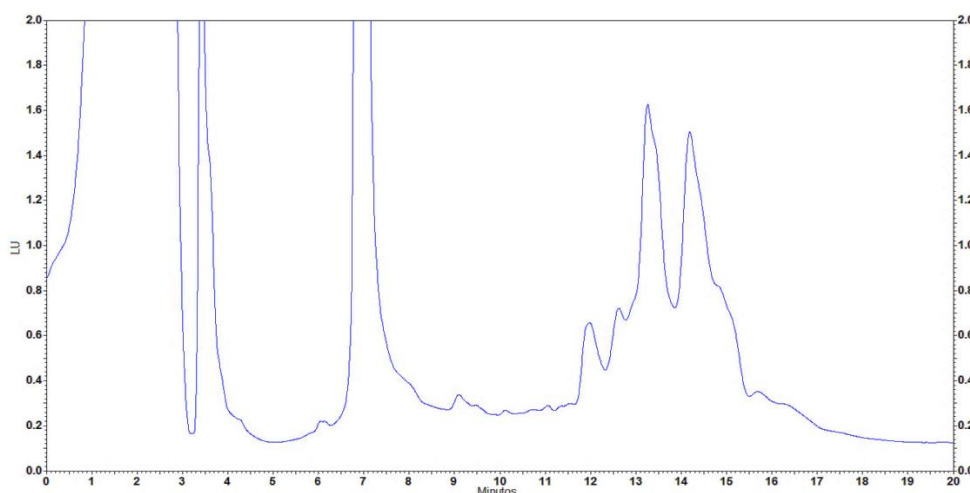


**Figura 13.** Cromatograma de un estándar 50 µM en condiciones óptimas.

Adicionalmente, después de cada muestra y para realizar cada repetición se implementó un lavado antes de cada análisis, como se describe en la metodología; este lavado se incluyó para evitar la saturación de sales debido a la gran concentración del buffer y porque la repetitividad de la muestra se veía alterada ya que se generaba saturación de la columna, observándose un corrimiento en el pico de interés y una distorsión de dicha señal, las figuras 14 y 15 permite observar los fenómenos descritos anteriormente.



**Figura 14.** Cromatograma con una composición de fase móvil 82:8 de BPP : ACN.



**Figura 15.** Cromatograma de una repetición sin hacer lavado previo.

### 7.1.3. Cadena de frío

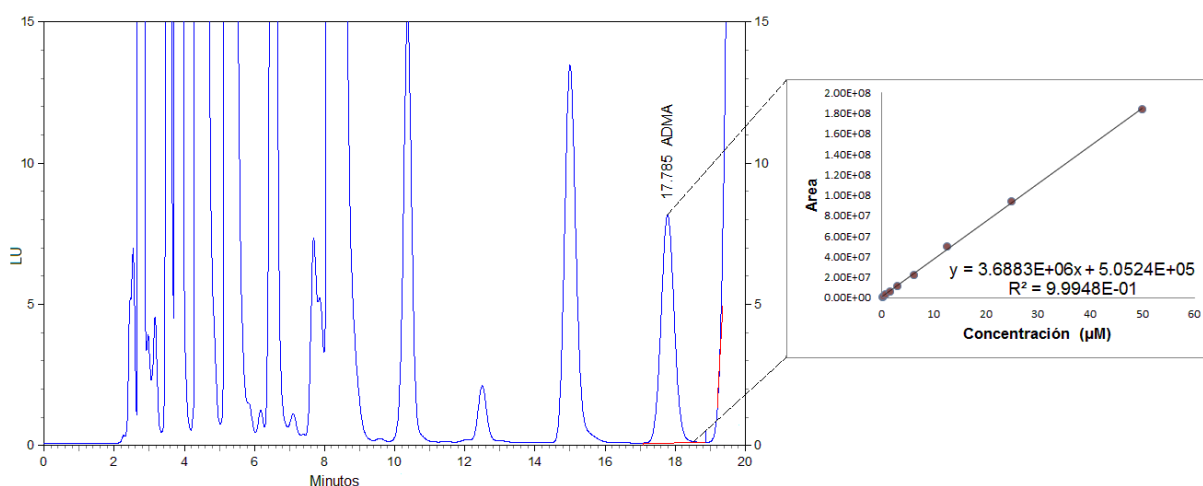
Cada uno de los análisis realizados se hicieron aplicando una cadena de frío, con el fin de garantizar que los estándares y las muestras tuviesen una temperatura de 3 °C aproximadamente al momento de la inyección al HPLC; esto se implementó debido a que el compuesto derivatizado sufre una segunda reacción de descomposición, lo cual se comprobó observando el cambio en las señales proporcionadas por infrarrojo en el tiempo.

Las figuras 16, permite observar el espectro infrarrojo de la solución recién preparada de ADMA y OPA, en este se observan una superposición de bandas entre  $3377\text{--}3105\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a las vibraciones de tensión asimétricas de los grupos -OH y -NH, pero no se observan bandas representativas, por el contrario, la figura 17 que fue tomado 30 minutos después de haber realizado la solución, permite observar una gran cantidad de bandas, en las cuales se vuelven a observar la superposición de bandas correspondientes a las vibraciones de tensión asimétrica de los grupos -OH y -NH entre  $3300\text{--}3188\text{ cm}^{-1}$ ; adicionalmente, a  $1558\text{ cm}^{-1}$  se observa la aparición de una banda correspondiente a la vibración de tensión asimétrica del grupo carbonilo de la molécula. Cabe resaltar que esta solución se guardó en frío durante el período de espera para cada toma del espectro<sup>24</sup>.

La figura 18, es la toma de un espectro 30 minutos después de la preparación de la solución, con la diferencia que no se tuvo en cuenta la refrigeración de la solución; aquí se observa que no hay una aparición de una banda significativa en la región de aparición del grupo carbonilo, lo que permite deducir que una correcta refrigeración garantiza la estabilidad del derivado. (Ver anexo 3)

**7.2. OBJETIVO 2.** Cuantificar ADMA en plasma de mujeres gestantes y en plasma de cordón umbilical.

Durante el desarrollo del trabajo de investigación se usaron 20 muestras de plasma de mujeres gestantes y 20 muestras de plasma de cordón umbilical, ambos grupos se cuantificaron usando la curva de calibración presentada en la figura 19.



**Figura 19.** Curva de calibración para la cuantificación de ADMA.

Para el grupo de mujeres gestantes se cuantificó el 65% de las muestras, mientras que para el grupo de los neonatos se logró cuantificar un 45% del total de muestras utilizadas; utilizando el software estadístico SPSS (statistics version 17.0), se determinó un límite de detección de 1,2 µM y un límite de cuantificación de 4,1 µM; adicionalmente, las medidas presentaron coeficiente de variación del 4,2%, lo cual indica que a pesar del uso de condiciones simples como una centrifugación para la purificación de la muestra nos permite obtener resultados con un porcentaje muy bajo de datos alejados de la media estadística.

Para cada uno de los dos grupos se determinó mediante el software anteriormente mencionado los intervalos de confianza con una probabilidad del 95%, obteniendo que para las muestras de plasma en cordón es de  $0,367 \pm 0,0180 \mu\text{M}$  y para las de plasma en gestantes es de  $0,377 \pm 0,0263 \mu\text{M}$ .

**7.3. OBJETIVO 3.** Evaluar la correlación entre los niveles plasmáticos de ADMA en las mujeres gestantes y los niveles en cordón umbilical.

Para determinar si existe una correlación entre los niveles plasmáticos de ADMA en los análisis realizados en ambos grupos, se hace uso de una correlación de Pearson y de Spearman. Al realizar el análisis descriptivo para observar la distribución de los datos, Shapiro-Wilk, nos permite inferir que los datos de cordón presenta una distribución normal con un valor de 0.417, sin embargo, los datos de las madres presentaron un valor de 0.010, lo cual indica una distribución anormal de los valores obtenidos, por ende, para realizar el análisis de correlación se debe usar una correlación de Spearman.

La correlación de Spearman arroja un valor de 0.567 el cual indica que existe una tendencia en los datos y es justificada porque a su vez en el coeficiente de Pearson se observa una relación directa con un valor del coeficiente de 0.69; estos resultados se presentan debido a que el número de muestras analizado fue muy pequeño (18) haciendo que el análisis estadístico sea más complejo.

Las gráficas 8 y 9 permiten visualizar la dispersión de los valores obtenidos tanto para los neonatos como para las mujeres gestantes, donde se infiere que la dispersión es mayor en los valores encontrados en las mujeres gestantes que en los neonatos debido al pequeño valor de  $n$  y por las condiciones psicológicas de cada una de las madres; adicionalmente, como las muestras analizadas son de madres sin ninguna patología, el paso de nutrientes a través del cordón hacia el neonato se encuentra regulada, por ende, se disminuye la variabilidad en los niveles de los diferentes macro y micronutrientes.

## 8. CONCLUSIONES

Se estandarizó una metodología para la determinación de Dimetilarginina asimétrica mediante HPLC con detector de Fluorescencia con un coeficiente de variación del 4.2%. En esta metodología el tiempo de análisis por muestra es de cuarenta minutos y no requiere pretratamiento de purificación usualmente costoso; adicionalmente, se implementó una cadena de frío para el análisis de los estándares y las muestras garantizando la repetitividad de los resultados y la estabilidad del agente derivatizante y el compuesto derivatizado.

El trabajo investigativo permitió obtener un método con resultados confiables y con límites de detección y cuantificación de 1,2  $\mu\text{M}$  y 4,1  $\mu\text{M}$  respectivamente; facilitando la detección de la dimetilarginina asimétrica en el plasma sanguíneo y generando expectativas para un análisis posterior de una cantidad de muestras y grupos determinados para la detección temprana de patologías.

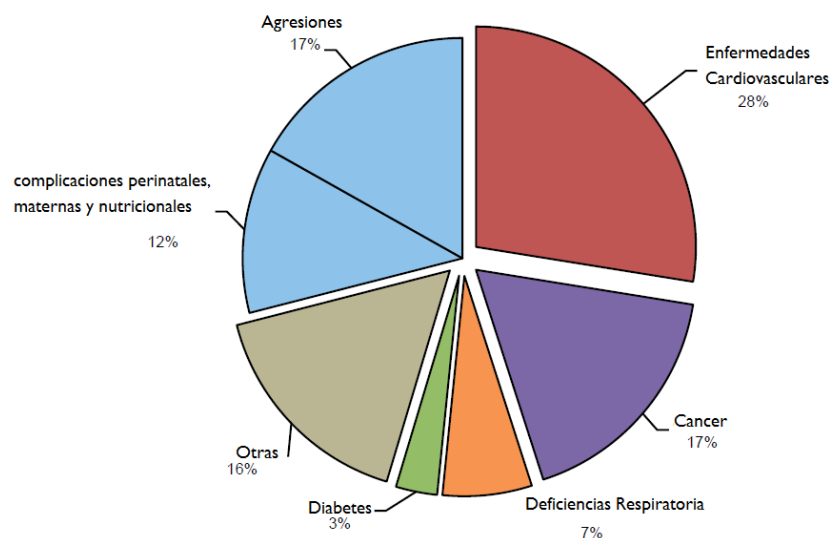
Se realizó una correlación entre los datos obtenidos de los grupos de las madres y los neonatos usando el coeficiente de Pearson y Spearman observando una tendencia directamente proporcional entre cada uno de los valores obtenidos; además se observó la dispersión de los datos obtenidos en ambos grupos siendo mayor en los niveles plasmáticos en madres que en los neonatos.

## 9. REFERENCIAS

1. C.L. Borders, Jr. *Protein Science*. **3**, 541-548 (1994).
2. Gui, S. and Colaboradores. *Biochem*. **52**, 199-209 (2013).
3. Kolbel, K. and Colaboradores. *Biochem*. **51**, 5463-5475 (2012).
4. Yoshimatsu, M. and Colaboradores. *Int. J. Cancer*. **128**, 562-573 (2011).
5. Achala de Mel and colaboradores. *Chem. Rev*. **111**, 5742-5767 (2011).
6. Teerlink, T. and Colaboradores. *Pharmacol. Research*. 1-12 (2009).
7. Teerlink, T. and Colaboradores. *Anal. Biochem*. **303**, 131-137 (2002).
8. Horowitz, J. J. *Chromatogr. B*. **851**, 42-50 (2007).
9. Ibolya Molnár-Perl. *J. Chroma. B*. **879**, 1241-1269 (2011).
10. Leiper, J. and Vallance, P. *Cardiovascular Research*, **43**, 542-548 (1999).
11. Pope, A. *Pharmacol. Research*. **60**, 461-465 (2009).
12. Magnolia, L. and Colaboradores. *Biochem*. **50**, 8226-8240 (2011).
13. Osborne, T. and Colaboradores. *Biochem*. **46**, 13370-13381 (2007).
14. Murray-Rust, J. and Colaboradores. *Natural Struct. Bio*. **8**, (8), 679-683 (2001).
15. Closs, E. and Colaboradores. *Biol. Chem*. **1**, 65-73 (1997)
16. Li-Tung Huang. and Colaboradores. *Int. J. Mol. Sci*. **13**, 14606-14622 (2013).
17. Garcia Alvarez-Coque. and Colaboradores. *Anal. Biochem*. **178**, 1-7 (1989).
18. Kehr, J. *Microdialysis*. 1-4 (1993).
19. WHO. World Health Statistics. 2014.
20. WHO. Noncommunicable Diseases: Country profiles. 2014.
21. Boger, R. and Colaboradores. *Pharmacol. Res*. **60**, 481-487 (2009).
22. Speer, P. and Colaboradores. *Am. J. Obstet. Gynecol*. **198**, 1-7 (2008).
23. Blackwell, S. *Clinica Chimica Acta*. **401**, 14-19 (2009).
24. Zuluaga, F., Yates, B. and Insuasty, B. Análisis Clásico Orgánico y Espectral. pp 179.

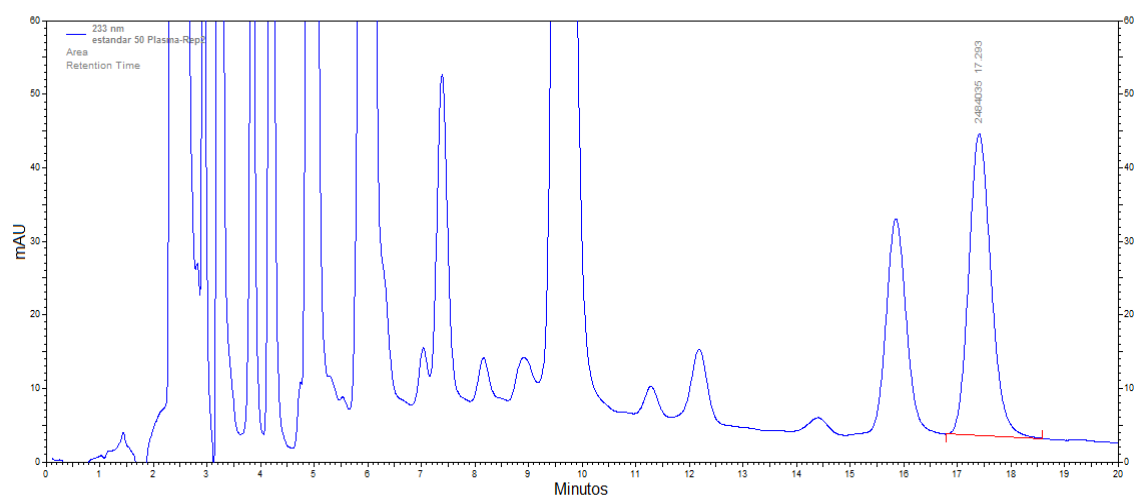
## 10. ANEXOS

### 10.1. Anexo 1. Muertes en Colombia, porcentajes de un total de 202000 muertes.

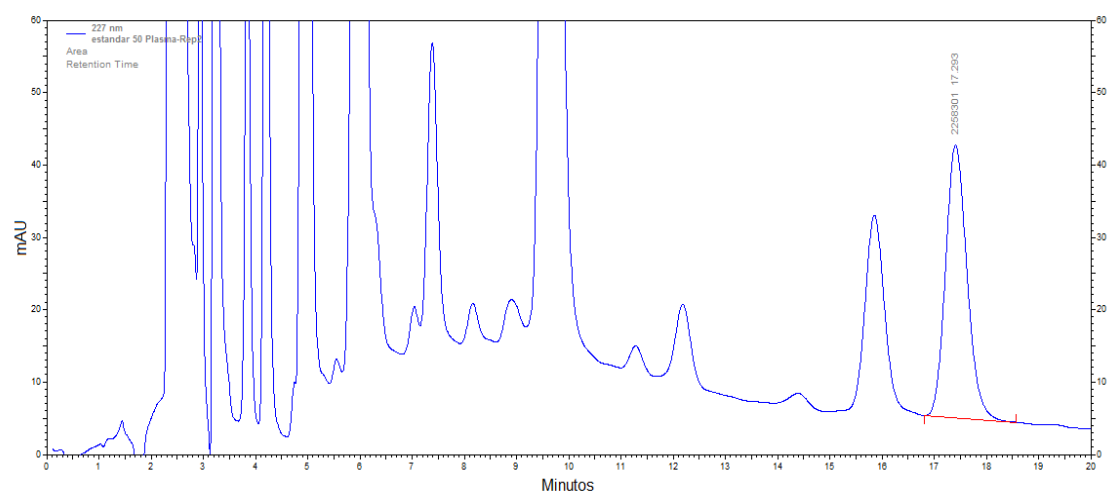


**Figura 20.** Porcentaje de muertes en Colombia.

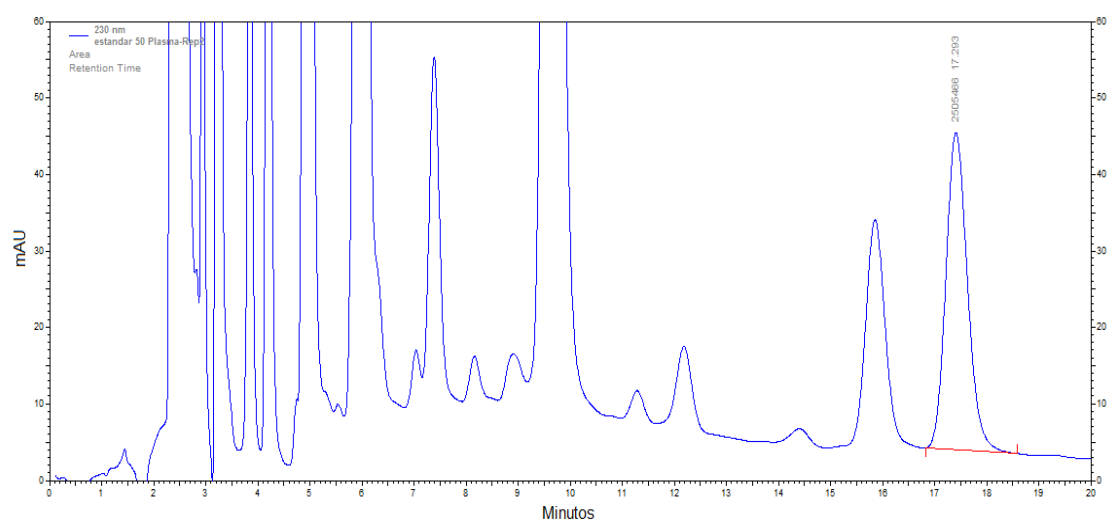
### 10.2. Anexo 2. Cromatogramas para la determinación de la longitud máxima de absorción del la Dimetilarginina asimétrica derivatizada con OPA.



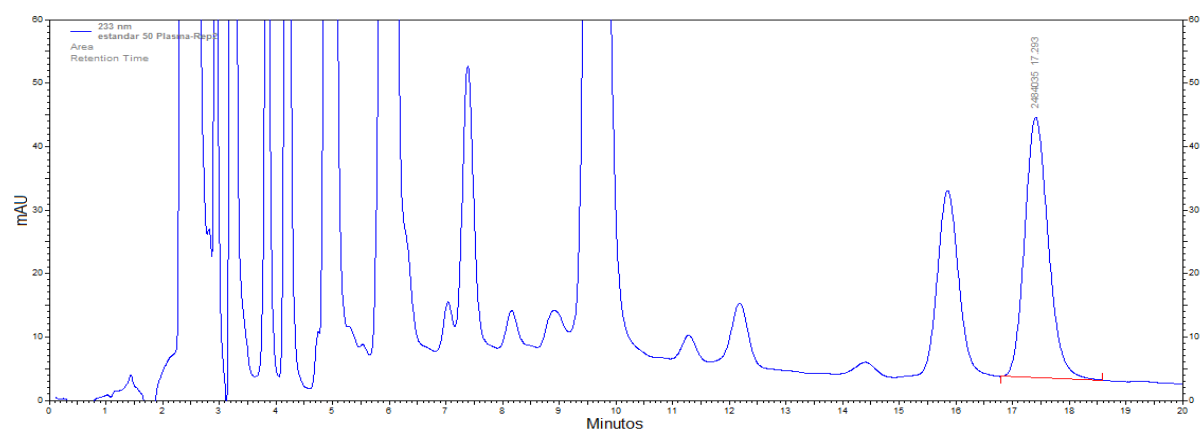
**Figura 21 .** Cromatograma obtenido a una  $\lambda=223$  nm.



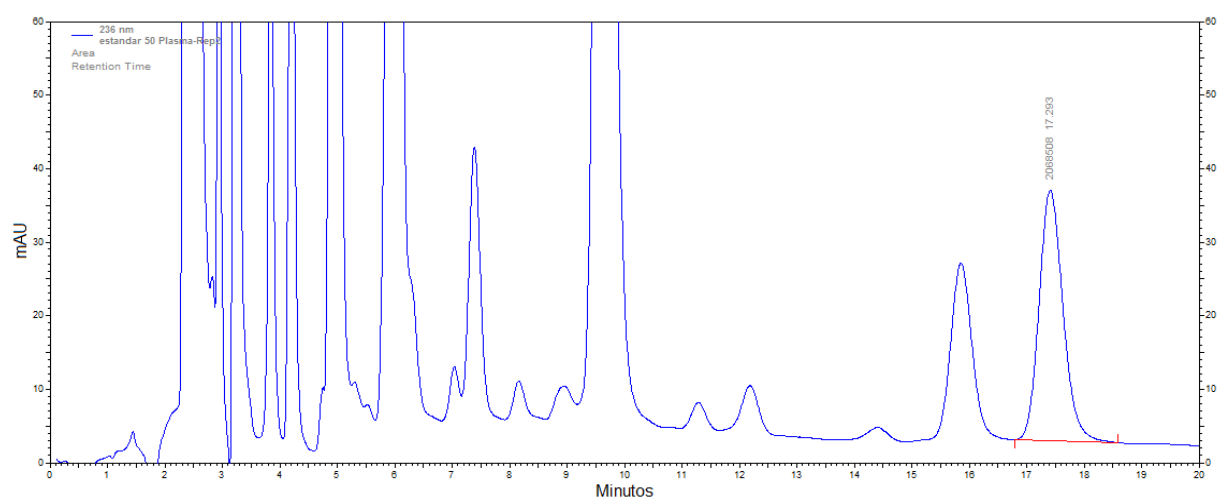
**Figura 22.** Cromatograma obtenido a una  $\lambda=226$  nm



**Figura 23.** Cromatograma obtenido a una  $\lambda=230$  nm

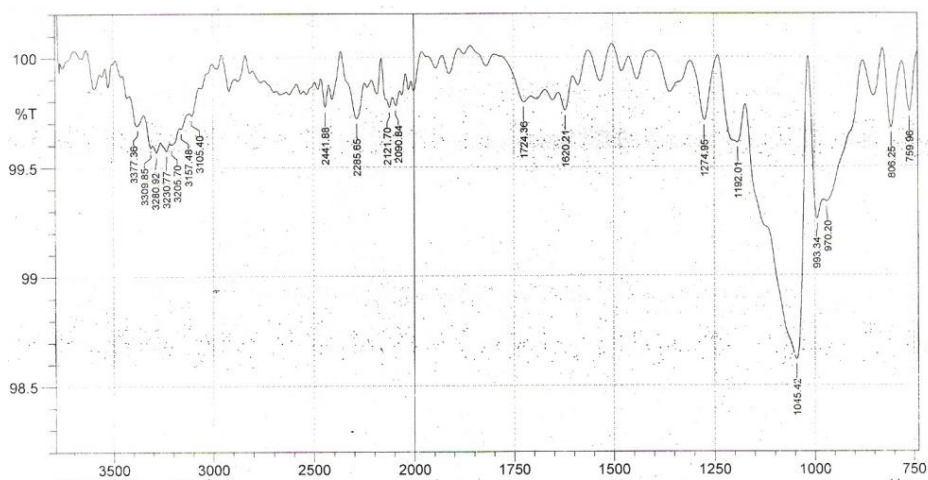


**Figura 24.** Cromatograma obtenido a una  $\lambda=233$  nm

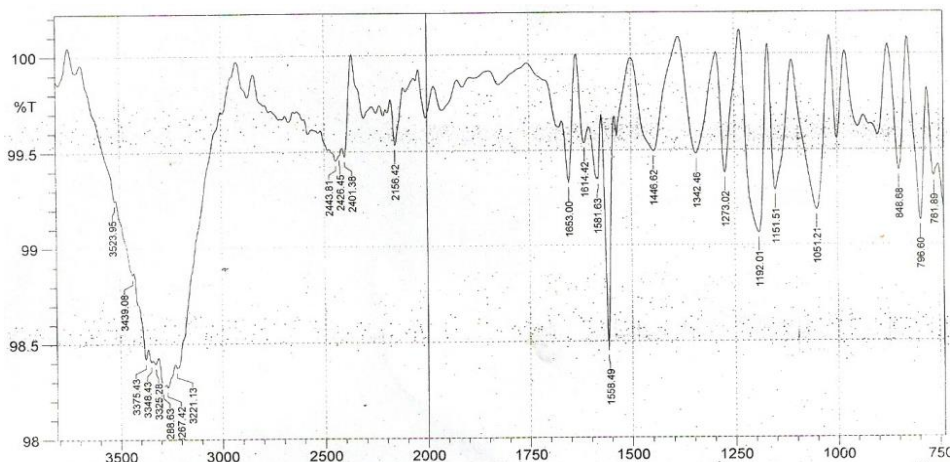


**Figura 25.** Cromatograma obtenido a una  $\lambda=236$  nm

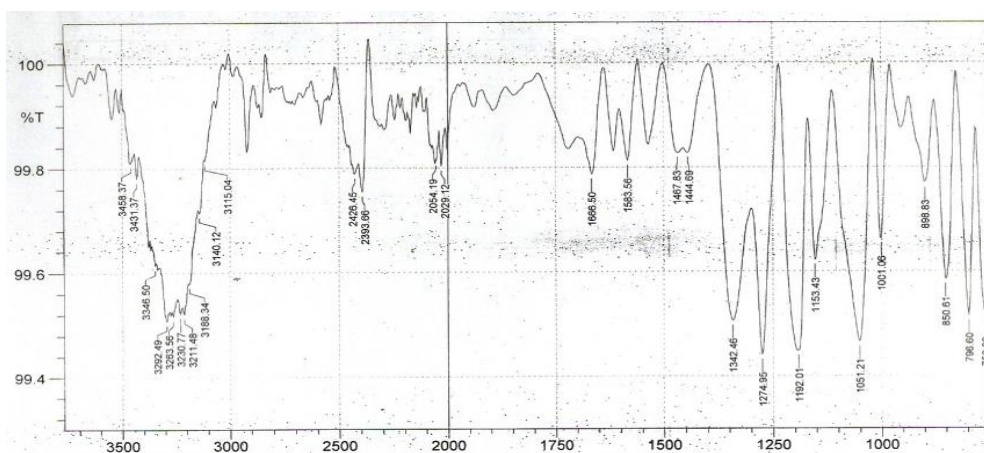
### 10.3 Anexo 3. Espectros de Infrarrojo.



**Figura 16.** Espectro Infrarrojo recién preparada la solución



**Figura 17.** Espectro Infrarrojo 30 minutos después de la preparación (en frío).



**Figura 18.** Espectro Infrarrojo 30 minutos después de la preparación (ambiente).