

Títol del treball: Determinació d'aminoàcids lliures en plasma de pacients amb ictus amb tractament trombolític

Estudiant: Eva Mateo Sendino

Grau en Biologia

Correu electrònic: u1916665@campus.udg.edu

Tutor: Juan Manuel Sánchez

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Juan Manuel Sánchez

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): juanma.sanchez@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 29-05-2015

Agraïments

La realització d'aquest treball ha estat possible gràcies a una sèrie de persones a les que els hi vull agrair profundament el seu suport i temps:

Per començar m'agradaria agrair-li a la meva àvia, ja que ella va ser la inspiració i em va proporcionar l'impuls necessari per escollir aquest treball.

Al Doctor Juan Manuel Sánchez, per fer possible la realització de l'estudi i haver-me deixat treballar en l'àrea de química analítica, per haver tingut la paciència i amabilitat de resoldre els dubtes que m'han anat sorgint durant el treball i el seu suport alhora de realitzar les correccions pertinents.

Als meus pares i la meva germana, pel seu suport incondicional que només una família et pot oferir encara que no acabin d'entendre amb exactitud el què estàs estudiant, però et motiven a continuar.

A Ferran Marzà per proporcionar-me la seva ajuda, tranquil·litat i paciència quan la més necessitava, per mantenir la calma en els moments on regnava l'estrès i pel seu suport incondicional en tot moment, inclús en situacions on no me'l mereixia.

Als companys de la Universitat, com en Marc, les Júlies, la Mariona, en Mario i en David, per estar sempre disponibles per prendre un cafè o fer un descans, en moments on la inspiració brillava per la seva absència. A en Víctor i la Júlia, tot i estar lluny, han estat un suport important per acabar de realitzar el treball, com totes les altres persones.

Índex

Resum.....	2
Resumen.....	3
Abstract	4
Introducció	5
L' Ictus.....	5
Base molecular	5
Glutamat.....	6
Tractament de l' ictus	7
Aminoàcids	8
Anàlisi de biofluids.....	9
Objective.....	10
Materials i mètodes.....	11
Reactius, solucions i material.....	11
Instrumental	11
Gradient.....	11
Preparació de les mostres	12
Preparació dels patrons.....	13
Anàlisi de les mostres	13
Resultats	15
Efecte del pH de la fase mòbil sobre el temps de retenció dels analits.....	15
Quantificació dels aminoàcids presents en el plasma	18
Anàlisi estadístic	19
Discussió	24
Conclusions.....	25
Bibliografia.....	26

Resum

La isquèmia cerebral o ictus és una malaltia cerebrovascular originada per una reducció de l'arribada del flux sanguini a una determinada zona del cervell. Es tracta de la primera causa de discapacitat en adults i la segona causa de mort a nivell mundial (Jin et al., 2010). La insuficiència de sang en el cervell provoca canvis en el metabolisme neuronal, com l'entrada massiva de calci intra-cel·lular, ocasionat pel dèficit d'oxigen i de nutrients necessaris (Guevara et al., 2004). L'augment citosòlic de calci, permet l'alliberament de diversos neurotransmissors com ara el glutamat i l'òxid nítric. Una concentració elevada d'aquests neurotransmissors, té un efecte tòxic en la cèl·lula, ja que afavoreixen l'entrada de més calci i l'alliberació de radicals lliures (RLO) que tenen la capacitat de degradar proteïnes, àcids nucleics i fosfolípids (Guevara et al., 2004).

El factor temps és indispensable per tal d'evitar el màxim de dany possible, ja que si hi ha un reflux sanguini ràpid, es pot evitar la mort cel·lular. L'activador tissular plasminogènic recombinant (rt-PA) és l'únic tractament aprovat per combatre la isquèmia cerebral i té una limitació important: només és efectiu fins a un màxim de 3 hores des de l'inici de l'ictus (Fernández-gómez et al., 2008).

L'objectiu d'aquest estudi és l'anàlisi i quantificació de la concentració d'aminoàcids lliures, presents en el plasma sanguini de pacients que han patit ictus i se'ls hi ha subministrat el tractament. L'anàlisi dels aminoàcids, s'ha dut a terme realitzant una derivatització de les mostres i posteriorment una cromatografia líquida d'alta resolució en fase invertida, amb una columna Gemini NX-C18 (250 X 4,4 mm) amb 5µm de mida de partícula i detecció per UV. Com a fase mòbil s'ha utilitzat una solució tamponada A d'acetat/fosfat ajustada a un pH 5,38 i una solució orgànica B formada per acetonitril (60%).

En altres estudis (Tcherkas et al., 2001), els pacients no tractats amb rt-PA, mostren un augment progressiu dels nivells de glutamat, que pot arribar fins a 15 dies. Els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que el tractament amb rt-PA té un efecte significatiu en el comportament de determinats aminoàcids, com el glutamat, ja que manté la concentració a nivells estable. Aquests resultats indicarien que el rt-PA no tan sols actua dissolent els coàguls formats sinó que, a nivell molecular, també actua evitant l'increment dels nivells de neurotransmissors (glutamat).

Resumen

La isquemia cerebral o ictus es una enfermedad cerebrovascular originada por una reducción de del flujo sanguíneo a una determinada área cerebral. Se trata de la primera causa de discapacidad en adultos y la segunda causa de muerte a nivel mundial (Jin et al., 2010). La insuficiencia de sangre en el cerebro genera cambios en el metabolismo neuronal, como la entrada masiva de calcio intra-celular, producido por el déficit de oxígeno y nutrientes (Guevara et al., 2004). El aumento de calcio celular, promueve la liberación de ciertos neurotransmisores como el glutamato y el óxido nítrico (NO). Una elevada concentración de éstos, tiene un efecto citotóxico ya que favorece la entrada de más calcio i la liberación de radicales libres (RLO) que tienen la capacidad de degradar proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Guevara et al., 2004).

El factor tiempo es indispensable para evitar el máximo daño posible, ya que si hay un reflujo sanguíneo temprano, se puede evitar la muerte celular. El activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA) es el único fármaco aprobado para tratar la isquemia cerebral aunque tiene una limitación importante: es efectivo hasta un máximo de 3 horas desde el inicio del ictus (Fernández-gómez et al., 2008).

El objetivo del presente estudio es el análisis y cuantificación de la concentración de aminoácidos libres, presentes en el plasma sanguíneo de pacientes que han sufrido un ictus y han sido tratados con rt-PA. El análisis de aminoácidos se ha llevado a cabo a partir de una derivatización de las muestras, seguido de una cromatografía líquida de alta resolución en fase invertida, con una columna Gemini NX-C18(259 X 4,4mm) con 5 µm de tamaño de partícula, y detección por UV. Como fase móvil se ha utilizado una solución tamponada A de acetato/fosfato ajustada a un pH 5,38 y una solución orgánica B formada por acetonitrilo (60%).

En otros estudios (Tcherkas et al., 2001), los pacientes no fueron tratados con rt-PA y muestran un aumento progresivo del glutamato que puede llegar hasta los 15 días. Los resultados obtenidos en este estudio indican que el tratamiento con rt-PA tiene un efecto significativo en el comportamiento de determinados aminoácidos, como el glutamato, ya que la concentración se mantiene a nivel estable. Estos resultados indican que el rt-PA no tan solo actúa como un trombolítico disolviendo el coágulo, sino que, a nivel molecular actúa evitando el incremento de la concentración de los neurotransmisores (glutamato).

Abstract

Cerebral ischemia or stroke is a cerebrovascular disease caused by a reduction of blood flow in a certain area of the brain. It is the leading cause of disability in adults and the second leading cause of death worldwide (Jin et al., 2010). The blood failure in the brain causes changes in the neuronal metabolism, such as massive entry of intra-cellular calcium, caused by a lack of oxygen and nutrients (Guevara et al., 2004). The increase of calcium intra-cytosolic enables the release of several neurotransmitters such as glutamate and nitric oxide. A high concentration of these neurotransmitters has a toxic effect on the cell, because of the stimulation of calcium entry and the release of free radicals (RLO) which has the capability to degrade proteins, nucleic acids and phospholipids (Guevara et al., 2004).

Time is an essential factor in order to prevent brain damage, if a fast blood reflux happens time can prevent cell death. The recombinant plasminogenic tissue activator (rt-PA) is the only approved treatment for combating cerebral ischemia, although it has an important limitation: it is only effective up to a maximum of three hours from the beginning of the stroke (Fernandez-Gomez et al., 2008).

The main goal of this study is to analyse and quantify free amino acids presented in the plasma of patients who have suffered an ischemic stroke and have been supplied with the rt-PA treatment. The aminoacids' test is performed by a derivatization of the samples, followed by a high resolution chromatography determination in a reverse phase, with a Gemini NX-C18 column (250 x 4.4 mm) with 5 μ m in size of Particle and UV detection. A buffered acetate/phosphate solution, adjusted to pH 5.38, and a B acetonitrile (60%) organic solution has been used as a mobile phase.

In other studies (Tcherkas et al., 2001), non treated rt-PA patients show a gradual increase on glutamate, that can reach to 15 days. The results obtained by this study prove that the rt-PA treatment has a significant effect on certain amino acids, such as glutamate, because it keeps the concentration at a stable level. These results suggest that rt-PA not only acts dissolving formed clots but also, in a molecular level, acts evading the level increase of neurotransmitters (glutamat).

Introducció

L'ictus

L'ictus és la primera causa de discapacitat en adults i la segona causa de mort a nivell mundial (Jin et al., 2010). Aproximadament, el 80% dels casos són produïts per ictus isquèmic i el 20% restant per hemorràgics (Fernández-gómez et al., 2008).

Es tracta d'una malaltia cerebrovascular causada per la disminució de l'arribada del flux sanguini, provocat majoritàriament per coàguls, que pot donar-se en una àrea determinada del cervell o de manera global. Conseqüentment, la falta d'oxigen i glucosa necessaris per al metabolisme acaba generant una àrea d'infart cerebral. Abans de que es produeixi la mort cel·lular, l'àrea involucrada resta en un estat anomenat "penombra isquèmica" on les cèl·lules es troben metabòlicament actives, però disminueix la seva excitabilitat elèctrica (Fernández-gómez et al., 2008). Si no es produeix un reflux de l'aport sanguini, la zona afectada pot derivar a mort cel·lular (Figura 1). Per aquest motiu, el factor temps és indispensable per tal d'evitar el màxim dany cel·lular possible (Guevara et al., 2004).

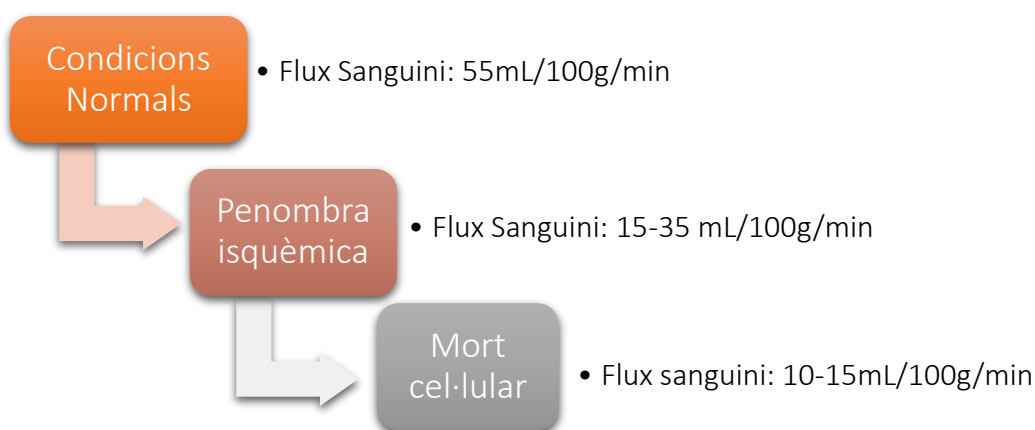


Figura 1. Variació del flux sanguini a les diferents fases de l'ictus isquèmic.

Base molecular

La manca de l'arribada del flux sanguini cerebral produeix una deficiència en l'aport d'oxigen i glucosa (Guevara et al., 2004). Sense aquest dos components les neurones pateixen una disminució del metabolisme, ja que s'altera la respiració mitocondrial; per tant la cèl·lula no sintetitza ATP ni fosfocreatina. A més, les neurones metabolitzaran la glucosa de reserva en àcid làctic. L'augment de l'àcid làctic produeix una acidificació intracel·lular que provoca la desnaturalització de proteïnes i altera la funció d'una sèrie d'enzims pH-dependents, generant la formació de radicals lliures i l'activació d'una sèrie de neurotransmissors com, per exemple, el glutamat (Neumar, 2000).

La falta d'ATP altera el funcionament de la bomba de sodi-potassi, provocant un procés de despolarització, amb la conseqüent entrada massiva de calci a l'interior cel·lular i sortida de sodi a l'exterior. Si la concentració de calci intracel·lular supera un determinat llindar, la cèl·lula es sobreexcita i pot morir per apoptosi. El calci lliure provoca una cascada d'activació d'una sèrie d'enzims proteolítics i lipolítics que poden anul·lar de forma permanent la regulació del metabolisme en les neurones.

Glutamat

El glutamat, en condicions fisiològiques, és un neurotransmissor del sistema nerviós que activa una sèrie de factors de transcripció. El glutamat és reconegut per una sèrie de receptors que poden ser metabotròpics o ionotròpics. Es coneixen 3 de tipus ionotròpic: N-metil-D-aspartat (NMDA), alpha-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropinoic (AMPA) i els Kainat. Pel que fa als dos darrers, tenen una certa permeabilitat per al pas d'ions, tant de sodi com de potassi i, en menys mesura, de calci. En canvi, els receptors NMDA són més permeables als ions de calci (Hazell, 2007).

Al tractar-se d'un neurotransmissor excitador, s'ha de regular la concentració del glutamat ja que en dosis elevades pot ser citotòxic. Per aquets motiu hi ha un reciclatge continu d'aquest neurotransmissor, procés en el que els astròcits juguen un paper molt important (Hazell, 2007).

Quan es produeix un ictus isquèmic, l'elevada concentració de calci intracel·lular promou l'alliberament del glutamat com a neurotransmissor. Aquest activarà els receptors NMDA i AMPA produint una major entrada de calci citosòlic, augmentant així la citotoxicitat cel·lular.

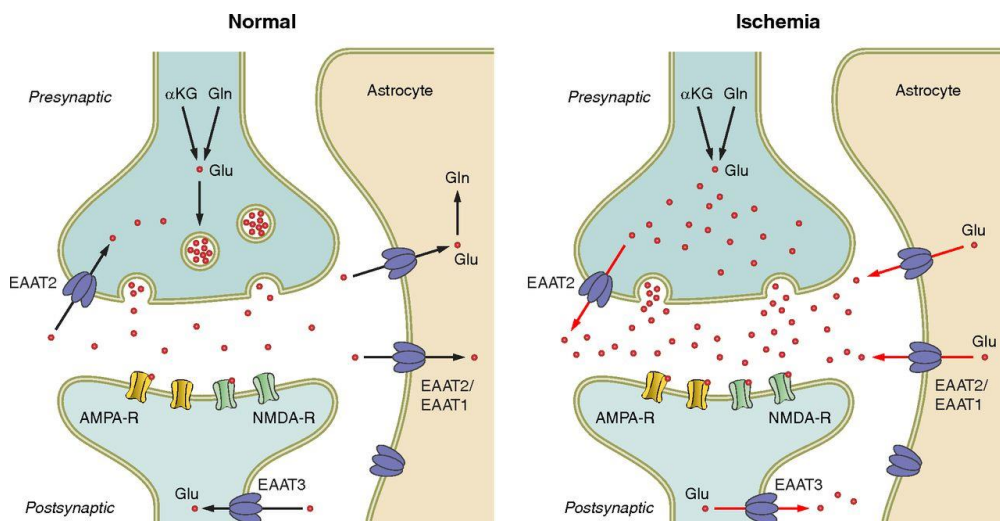


Figura 2. Recaptació de glutamat per part dels astròcits en condicions normals i quan es produeix la isquèmia (Vandenberg et al., 2013)

Com s'ha esmentat, és molt important el reciclatge d'aquest aminoàcid per mantenir la viabilitat cel·lular. A l'haver una sobreexpressió de glutamat, els astròcits no són capaços de captar-lo i, per tant, de reciclar-lo (Figura 2). Una elevada concentració de glutamat promou l'entrada de més calci i això desencadena la formació de radicals lliures, disfunció mitocondrial i l'activació de fosfolipases, proteases i lipases que afavoreixen la mort cel·lular (Figura 3). L'augment de calci intracel·lular també promou l'activació de processos inflamatoris que ajuden a augmentar la citotoxicitat cel·lular.

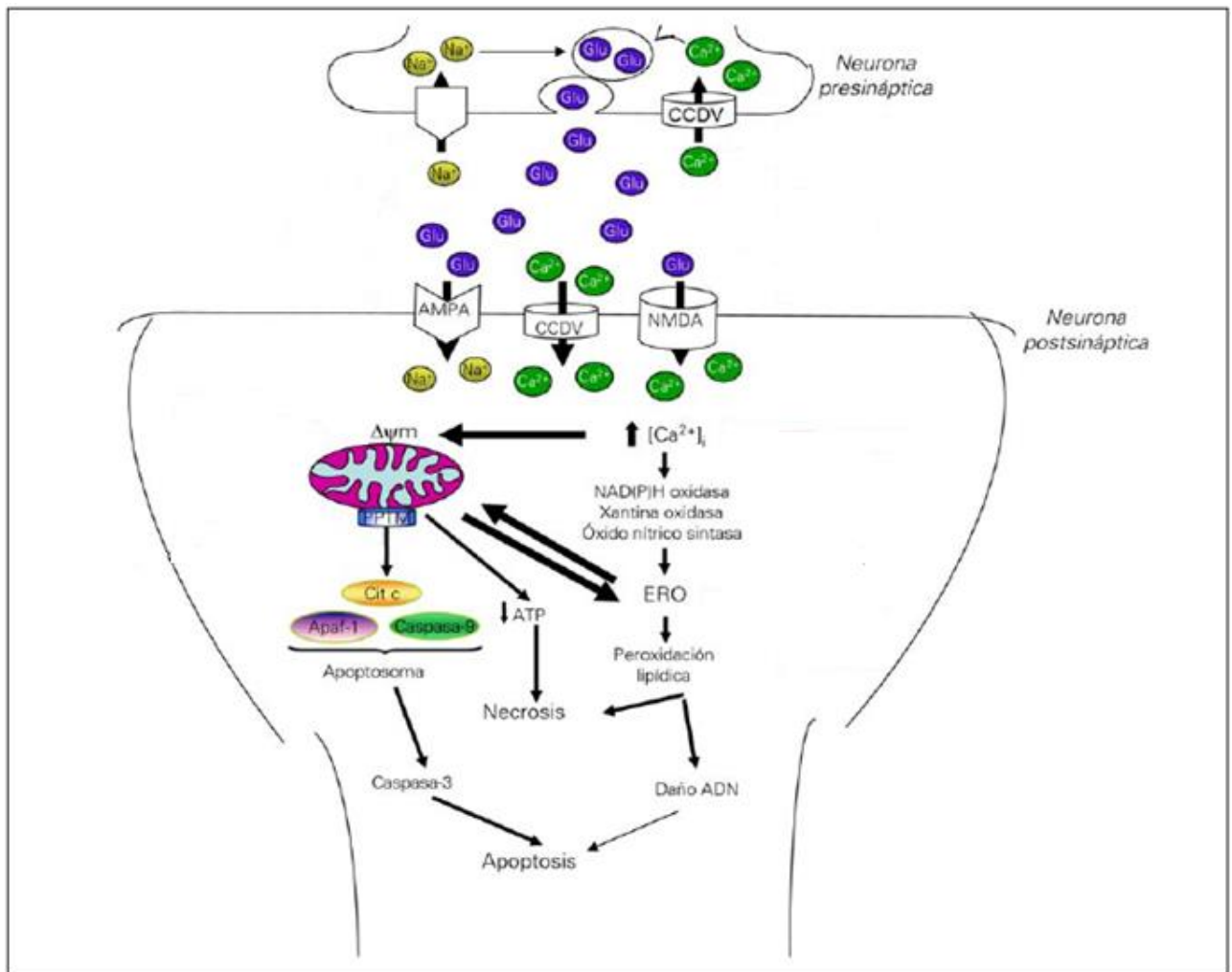


Figura 3. Les diferents rutes que succeeixen a la neurona quan es produeix l'ictus isquèmic. (Fernández-gómez et al., 2008)

Tractament de l'ictus

A l'any 1996 es va aprovar el subministrament de l'activador tissular plasminogènic recombinant (rt-PA) intravenós en pacients amb ictus isquèmic, des de llavors és l'únic fàrmac aprovat per combatre aquesta malaltia (Troke et al., 1995). El rt-PA és un trombolític, és a dir, té la capacitat d'augmentar la transformació endògena de plasminogen a plasmina, amb la conseqüent destrucció de fibrina i, per tant, amb la dissolució dels coàguls en sang que obstrueixen els vasos.

Tot i ser l'únic medicament aprovat, presenta limitacions. La més important és que només és efectiu fins a un màxim de 3 hores des de l'inici de l'ictus. Transcorregut aquest període de temps, l'efecte és contraproduent. El fàrmac també presenta efectes secundaris i, a vegades, pot produir hemorràgies internes (Fernández-gómez et al., 2008a). Per aquest motiu, s'estan buscant altres fàrmacs que no només donin lloc a la dissolució de coàguls, sinó que actuïn com a neuroprotectors per tal d'evitar la cascada bioquímica que es produeix durant la isquèmia.

Aminoàcids

Els aminoàcids són la base de tots els processos cel·lulars, ja que són absolutament necessaris en els processos metabòlics perquè són precursors dels pèptids i proteïnes. L'estructura general dels aminoàcids està basada en un carboni central ($C\alpha$) que es troba unit a 4 estructures diferents: el grup carboxil ($-COOH$), un grup amino ($-NH_2$), un hidrogen i una cadena lateral (R) que és específica per a cada aminoàcid. El grup carboxil i el grup amino, confereixen el comportament amfòter dels aminoàcids. De forma natural en les proteïnes només es troben els alfa aminoàcids, aquests contenen el grup amino i el grup carboxil unit al primer carboni de la cadena, també anomenat carboni α . Exceptuant la glicina, aquestes molècules presenten un carboni quiral.

En els gens de tots els organismes estan codificats 20 aminoàcids diferents que s'incorporen per formar proteïnes. S'ha observat una clara preferència dels aminoàcids que formen les proteïnes per l'enantiòmer L, de fet a la natura només es troben d'aquest tipus (Mathews, 2002).

Els 20 aminoàcids són diferents entre ells gràcies a la cadena lateral R. Aquesta diversitat de monòmers, permet a les proteïnes exhibir una gran varietat d'estructures i propietats bioquímiques. S'ha proposat classificar de moltes maneres els aminoàcids, però cap d'elles resulta satisfactòria.

Depenent de la cadena R de cada aminoàcid es poden classificar en:

- En funció de la naturalesa química:
 - Àcids: àcid aspàrtic (Asp), àcid glutàmic (Glu), aspargina (Asn) i glutamina (Gln).
 - Basics: histadina (His), lisina (Lys) i arginina (Arg).
 - Aromàtics: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptòfan (Trp).
 - Alifàtics: glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile).
 - Amb grup hidroxil: serina (Ser), treonina (Thr).
 - Amb grup sulfur: cisteïna (Cys) i metionina (Met).
 - Aminoàcids cíclics: prolina (Pro).
- En funció de la polaritat:
 - Apolars sense càrrega (Ala, Val, Met, Phe, Ile, Leu, Trp i Pro)
 - Polars sense càrrega (Gly, Asp, Gln, Tyr, Cys, Ser i Thr)
 - Polars amb càrrega positiva (Lys, His i Arg)
 - Polars amb càrrega negativa (Asp i Glu)

Fins al moment, s'han considerat els 20 aminoàcids que codifiquen en el DNA per proteïnes. No obstant, el repertori de grups de cadenes laterals en les proteïnes es pot modificar químicament una vegada els aminoàcids s'han unit. Aquest tipus de molècules reben el nom d'aminoàcids modificats i són: Fosfoserina, 4-Hidroxiprolina, δ - Hidroxilina i l'àcid γ -carboxiglutàmic (GABA).

Els aminoàcids tenen la capacitat d'unir-se covalentment entre ells a partir de la formació d'un enllaç amida entre el grup α -carboxil d'un aminoàcid i el grup α -amino d'un altre. A aquest enllaç se l'anomena enllaç peptídic i el producte de la unió s'anomena pèptid. L'agrupació de molts pèptids s'anomena polipèptid i són les anomenades proteïnes. (Lehninger, 1995)

No només són exclusius en l'organisme els aminoàcids presents en les proteïnes, sinó que hi ha d'altres que duen a terme funcions importants en el metabolisme. Els aminoàcids intervenen en diferents processos biològics i per aquets motiu és interessant analitzar-los quantitativament, ja

que poden proporcionar informació rellevant en diferents àrees d'investigació com, per exemple, en recerca biomèdica, bioenginyeria o biotecnologia alimentària. Anteriorment s'ha esmentant la importància del glutamat com a neurotransmissor del sistema nerviós central i la importància de mantenir una concentració constant d'aquest. També, s'ha fet menció del paper que juga el glutamat durant un accident cerebrovascular isquèmic.

Anàlisi de biofluids

Els biofluids més utilitzat per realitzar anàlisis són la sang, plasma, sèrum, orina i fluid cerebroespinal. L'anàlisi del plasma s'utilitza per estudis amb caire metabòlic, ja que el plasma conté una complexa barreja de metabòlits que reflecteixen els canvis metabòlics. A més, l'obtenció d'aquest fluid és una tècnica poc invasiva si es compara amb el fluid cerebroespinal.

El plasma s'obté a partir de la centrifugació d'una mostra sanguínia anticoagulada. Per tant, el plasma sanguini no contindrà les cèl·lules presents en la sang, però sí la resta dels components. Per aquest motiu s'han de preparar les mostres de plasma depenent de cada objectiu, en aquest cas és d'interès el contingut d'aminoàcids lliures. L'anàlisi de les mostres es fa mitjançant la tècnica cromatogràfica líquida d'alta resolució (HPLC) en fase invertida i detecció per UV. Per tant, les mostres de plasma requereixen d'una etapa de "clean up" per a l'eliminació de molècules d'alt pes molecular que poden interferir en els resultats i poden deteriorar la columna analítica (Vicens, 2011).

L'anàlisi dels aminoàcids a partir de la cromatografia líquida d'alta resolució es va començar utilitzar a mitjans dels anys 60, quan va sorgir la necessitat de realitzar els anàlisis a partir de mostres més petites i de forma ràpida. Anteriorment, s'utilitzava la cromatografia d'intercanvi iònic, que és un mètode bastant exacte i reproducible (Vicens, 2011). Tot i així, aquest mètode conté una sèrie de limitacions significatives, com temps d'anàlisis llargs, sensibilitat limitada i presència de interferències de matriu. Però el desenvolupament de mètodes per HPLC el va anar desplaçant, ja que es tracta d'una tècnica molt més ràpida i amb una major sensibilitat (Cromatografia, n.d.).

Objective

The main goal of this study is to analyse and quantify free amino acids present in the plasma of patients who have suffered ischemic stroke and which have been supplied with rt-PA treatment. The analytical determination is first performed by derivatization of the samples, followed by determination by high resolution chromatography in reversed phase with UV detection.

Materials i mètodes

Reactius, solucions i material

Per a la preparació dels patrons, es va utilitzar un estàndard comercial de 17 aminoàcids (2,5 µmol/mL, excepte cisteína 1,25 µmol/mL): AMQ, Asp, Ser, Glu, Gly, His, NH₃, Arg, Thr, Ala, Pro, Cys, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu i Phe (Thermo SCIENTIFIC, USA). Com a agent derivatitzant es va emprar el kit AccQ-Fluor™ Reagent (Waters Corporation, USA).

La fase mòbil la componen dues solucions. La fase mòbil A es tracta d'una solució tampó d'acetat/fosfat ajustada a un pH de 5,38. El reactius utilitzats per a la preparació d'aquesta fase mòbil són acetat sòdic trihidratat, trietilamoni (TEA), acid fosfòric 80% i àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA), tots quatre de la casa Sigma-Aldrich, USA. La fase mòbil B es tracta d'una solució de caràcter orgànic formada per acetonitril (Fisher Chemical, USA) i aigua (60:40).

Per al clean-up de les mostres de plasma es van utilitzar filtres de centrifuga Amicon® Ultra-0.5 amb una mida de porus de 3000 Da (Millipore, USA).

Instrumental

Per a la derivatització de les mostres de plasma es va emprar una centrífuga per a tubs eppendorf de 1.5 mL (Thermo Scientific, USA), micropipetes BioPette plus (Labnet, USA), un bany termostàtic FB 15101 (Fisher Scientific, USA) i un vòrtex (Heidolph reax 2000, Països Baixos).

Per a l'elaboració de les fases mòbils es va emprar una balança (Sartorius, Alemanya), un pH-metre Basic 20 (Crison, Espanya), membranes de nylon de 0,45 µm (Whatman GmbH, Alemanya) i un bany d'ultrasons (P-selecta, Espanya).

Per a l'anàlisi de les mostres i dels estàndards es va utilitzar un equip d'HPLC Spectra System (Thermo Scientific), compost per una bomba P2000, un detector UV6000LP, un desgasificador al buit SCM1000 i un controlador electrònic SN4000. S'ha utilitzat com a fase estacionària una columna Gemini NX-C18 (250 X 4,4 mm) amb 5µm de mida de partícula (Phenomenex, USA). Per prevenir la saturació de la columna, es fa servir una pre-columna que actua com a filtre per tal d'evitar que la columna es danyi.

Per al tractament de les dades, s'ha utilitzat el paquet estadístic R commander.

Gradient

A la Taula 1 es mostra el gradient emprat en aquest estudi per a l'elució dels 20 aminoàcids lliures presents en les mostres de plasma sanguini.

Taula 1. Gradient d'elució

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
0,5	98	2
15	93	7
25	90	10
45	74	26
48	67	33
58	67	33
63	0	100
73	0	100
75	100	0
85	100	0

La metodologia que s'ha portat a terme en aquest estudi es pot diferenciar en dues parts principals:

1. Preparació de les mostres de plasma
2. Anàlisi cromatogràfica de les mostres

Preparació de les mostres

La secció de Neurologia de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta ha proporcionat les mostres que únicament contenen plasma sanguini. Les mostres de plasma es van conservar congelades a -80°C fins al moment de la seva anàlisi. Totes les mostres estaven seriades i separades en funció del temps transcorregut des de que s'havia subministrat el medicament al pacient i es va realitzar l'extracció de sang (Pre –just abans de subministrar el medicament-, 2h, 6h, 24h i 72h després d'aplicar el rt-PA).

Per tal de separar el contingut de proteïnes i altres molècules d'alt pes molecular presents en el plasma sanguini, s'agafa un volum de mostra (aproximadament 250 µL) i es col·loca en un filtre de centrifuga amb una mida dels porus de 3000 Da. Tot seguit es sotmet la mostra a un procés de centrifugació durant 20 minuts a 1200 rpm. Tot i que els mètodes convencionals per separar les proteïnes de les mostres de plasma es basen en la seva precipitació amb un dissolvent orgànic, un estudi previ portat a terme als laboratoris de Química Analítica de la UdG (Vicens, R., 2011) va demostrar dues avantatges significatives utilitzant la centrifugació amb aquests filtres: primer, no es produeixen pèrdues d'aminoàcids per co-precipitació amb les proteïnes, com pot passar en el cas del tractament amb dissolvent orgànic quan no es fa de forma molt lenta; segon, no es dilueix la mostra, el que permet millorar la sensibilitat del mètode. Un cop finalitzada la centrifugació, es separa el líquid filtrat, on són presents els aminoàcids lliures, i es sotmet a un procés de derivatització.

El procés de derivatització és essencial per poder analitzar els aminoàcids, ja que la majoria d'aquests no tenen propietats òptiques adequades per poder ser analitzats amb un detector ultraviolat. Per això, cal portar a terme una derivatització per tal de que els aminoàcids incorporin un anell aromàtic i siguin detectables.

Existeixen diferents reaccions de derivatització possibles per als aminoàcids, depenent dels compostos que es vulguin derivatitzar i de si el procés es porta a terme on-line o off-line (Vicens

R., 2011). En aquest estudi s'ha utilitzat com a reactiu derivatitzant el carbamat de 6-N-aminoquinol hidroxisuccinimidil (AQC), ja que el procés de derivatització amb aquest reactiu és simple i genera compostos estables a temperatura ambient durant més d'una setmana. L'AQC reacciona tant amb aminoàcids primaris com secundaris, l'excés de reactiu que genera és fàcilment separable dels aminoàcids i no influeix en els resultats.

Per tal de realitzar el procés de derivatització s'utilitza el kit comercial AccQ-Fluor™ Reagent de Waters. Es segueix el protocol indicat per la casa comercial. El reactiu derivatitzant AccQ-Fluor també es prepara seguint el protocol indicat per la casa comercial. Aquest reactiu és estable durant una setmana a temperatura ambient, però s'ha comprovat que si es conserva a 4°C la seva estabilitat s'allarga fins com a mínim tres setmanes.

Un cop realitzada la derivatització, la solució resultant s'incorpora a un insert de 200 µL que s'introdueix en un vial de 2 mL prèviament etiquetat, i es realitza l'anàlisi al cromatògraf de líquids. Si la mostra derivatitzada no es pot analitzar immediatament es conserva a 4°C, màxim una setmana, fins realitzar l'anàlisi cromatogràfic.

Preparació dels patrons

La dissolució stock és un estàndard que conté 17 aminoàcids. A partir d'aquesta, es preparen un mínim de sis patrons a diferents concentracions que tindran dos finalitats. Primer, tots els patrons s'utilitzen a l'inici de cada sèrie de mostres per portar a terme la calibració del mètode. Segon, alguns patrons són seleccionats aleatòriament com a mostres control per poder detectar i corregir possibles variacions en el sistema HPLC. En el nostre cas, s'ha analitzat un control cada 8-10 mostres, i es consideraven acceptables els resultats sempre que la desviació de la concentració mesurada respecte al control no superés els límits d'acció prèviament establerts, utilitzant gràfics de Shewart. El procés de preparació dels patrons és igual que el de les mostres, per tant es va emprar el protocol esmentat anteriorment.

També es van preparar controls de blanc que consistien en mostres d'aigua milli-Q derivatitzades amb el mateix protocol que les mostres de plasma. Aquests controls s'analitzaven al final de cada sèrie de mostres per confirmar que no existeix contaminació creuada entre mostres.

Per confirmar l'estabilitat del sistema, abans de procedir a l'anàlisi dels patrons i mostres s'injecta repetidament un patró fins a obtenir valors de temps de retenció estables per a cada aminoàcid (variacions inferiors a 0.1 min). Com ja s'ha indicat, també s'ha portat a terme l'anàlisi d'un control cada 8-10 mostres i finalment es realitza un control, tant de mostra com de blanc, al final de totes les sèries d'anàlisi.

Anàlisi de les mostres

L'anàlisi de les mostres es fa mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució, ja que permet la separació dels analits i realitzar determinacions quantitatives (Manz, A et al., 2004). Tal com s'ha esmentat anteriorment, s'ha fet servir la tècnica HPLC en fase invertida i detecció per UV a una longitud d'ona de 254 nm.

S'utilitza el programa ChromQuest 5.0 com a software, ja que permet la recollida i el càlcul de dades, i també el control de paràmetres. El programa permet integrar l'àrea de cada pic per

determinar la concentració de cada aminoàcid per mostra. Les dades que s'obtenen, es guarden en un document d'Excel per tal de calcular la concentració dels aminoàcids a partir de les corresponents corbes de calibració.

Per tal de preparar la fase mòbil A es va seguir el protocol descrit per Cohen i Michaud (1993).

Resultats

Efecte del pH de la fase mòbil sobre el temps de retenció dels analits

El paràmetre que permet diferenciar els components eluïts durant la cromatografia és el temps de retenció. Aquest és fàcilment modificable tenint en compte les característiques de la mostra a utilitzar i el sistema d'anàlisi.

En aquest estudi es volen separar els 20 aminoàcids naturals de l'excés de reactiu i altres compostos desconeguts que puguin ser presents a les mostres de plasma. Degut a l'elevada quantitat de compostos a separar, és essencial ajustar els diferents paràmetres per tal d'obtenir una bona separació de tots els components que s'eluiran.

La gran varietat d'hidrofilicitats dels aminoàcids fa necessari iniciar la separació amb una fase mòbil totalment aquosa (100% fase A) i acabar amb 100% de fase B. Iniciant la separació amb 100% de la fase mòbil A permetrà eluir primer els components hidrofílics, l'increment del percentatge de fase B a la barreja permetrà anar eluint seqüencialment els compostos més hidrofòbics.

A l'haver de treballar amb fases mòbils 100% aquoses, els temps necessaris per condicionar la columna després de cada anàlisi seran crítics. Les columnes convencionals C18 son 100% base sílice i totalment poroses. La metodologia Gemini comporta una modificació de l'estructura porosa de les partícules mitjançant l'ús d'un material organo-silà que incorpora ponts etilè (Figura 6). Aquesta nova estructura proporciona a les partícules una major estabilitat a valors de pH extrems, fa que la partícula presenti una superfície més homogènia, el seu temps de vida és significativament superior al de les partícules C18 convencionals i el condicionament de la columna al treballar amb solucions 100% aquoses és més senzill i reproducible. Les proves realitzades al laboratori quan es va comparar la columna Gemini a una C18 convencional equivalent (mateixa longitud, diàmetre i mida de partícula) van demostrar que el temps de vida de la columna Gemini és superior ja que els resultats en la reproductibilitat inter-dia dels resultats obtinguts s'allarga durant un període de temps i número d'anàlisis superior. A més, la pressió generada per la columna al sistema HPLC es redueix aproximadament un 35% al treballar amb la columna Gemini. També s'ha comprovat que el condicionament de la columna és més simple i els resultats per als compostos més hidrofílics son més reproduïbles. Per aquests motius es decideix treballar amb aquesta columna.

El principal problema del reactiu derivatitzant emprat (AMQ) és que l'excés de reactiu que es produeix com a resultat de la derivatització dels aminoàcids té un comportament cromatogràfic similar al dels aminoàcids més hidrofílics. Per això és convenient separar-lo adequadament de tots els compostos d'interès. Aquest efecte és més important al treballar amb detecció UV ja que aquest compost dóna un senyal molt intens a l'UV que pot interferir amb els analits si no es separen adequadament.

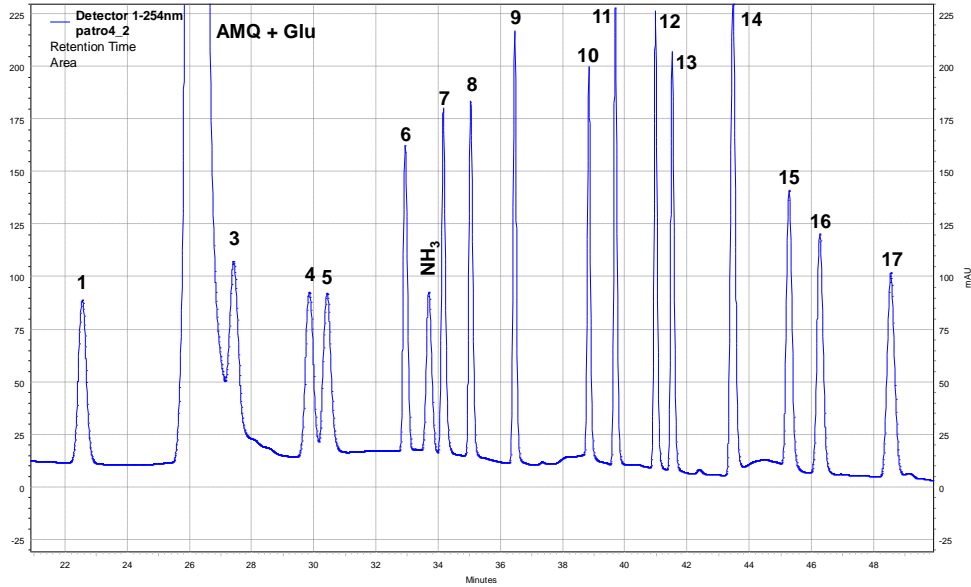


Figura 4. Cromatograma obtingut a l'anàlisi d'un patró contenint 17 aminoàcids. 1: Asp, 2: Glu; 3: Ser, 4: His, 5: Gly, 6: Arg, 7: Thr, 8: Ala, 9: Pro, 10: Cys, 11: Tyr, 12: Val, 13: Met, 14: Lys, 15: Ile, 16: Leu, 17: Phe . Fase mòbil A a pH=5.08

Els primers estudis es van portar a terme preparant la fase A al valor de pH indicat a la bibliografia per a columnes C18 (pH=5.08), però es va observar que el pic del glutamat es solapa amb el de l'excés de reactiu utilitzant la columna Gemini (Figura 4). Tenint en compte que aquest és l'aminoàcid de més interès en els estudis relacionats amb ictus, és clar que cal modificar el mètode per poder determinar Glu acuradament.

Alguns estudis han demostrat que el temps de retenció de l'AMQ és molt depenent del pH del tampó utilitzat quan es treballa amb fases estacionaries poroses C18 de base sílice convencionals (Hernández-Orte, P., et al., 2003). Per aquest motiu s'ha comprovat quin efecte pot tenir el pH en la columna Gemini utilitzada en aquest estudi. Es va anar augmentant el pH de la fase tamponada A i es va observar que el temps de retenció de l'excés d'AMQ s'incrementa de forma lineal (coeficient de correlació 0.9179) amb el pH del tampó (Figura 5). El temps de retenció dels aminoàcids més polars (Asp i Glu) no varia al modificar el pH en el rang avaluat (pH = 5.10-5.45). En el cas de la Ser, a l'igual que amb la resta d'aminoàcids, els temps de retenció no varien significativament en el rang de pH 5.10-5.30, però s'incrementen lleugerament a partir de pH=5.3. Aquest increment no és tan acusat com en el cas de l'AMQ però és més significatiu a mesura que s'incrementa la hidrofobicitat de l'aminoàcid.

Tal i com s'observa a la Figura 5, l'increment del pH per sobre de 5.3 no només permet separar adequadament el pic d'AMQ del de Glu, sinó que també permet obtenir una millor resolució entre els pics de Glu i Ser. Aquest efecte és molt important ja que a l'anàlisi de mostres de plasma s'observen els 20 aminoàcids naturals i molts interferents, no tan sols els 17 aminoàcids dels patrons.

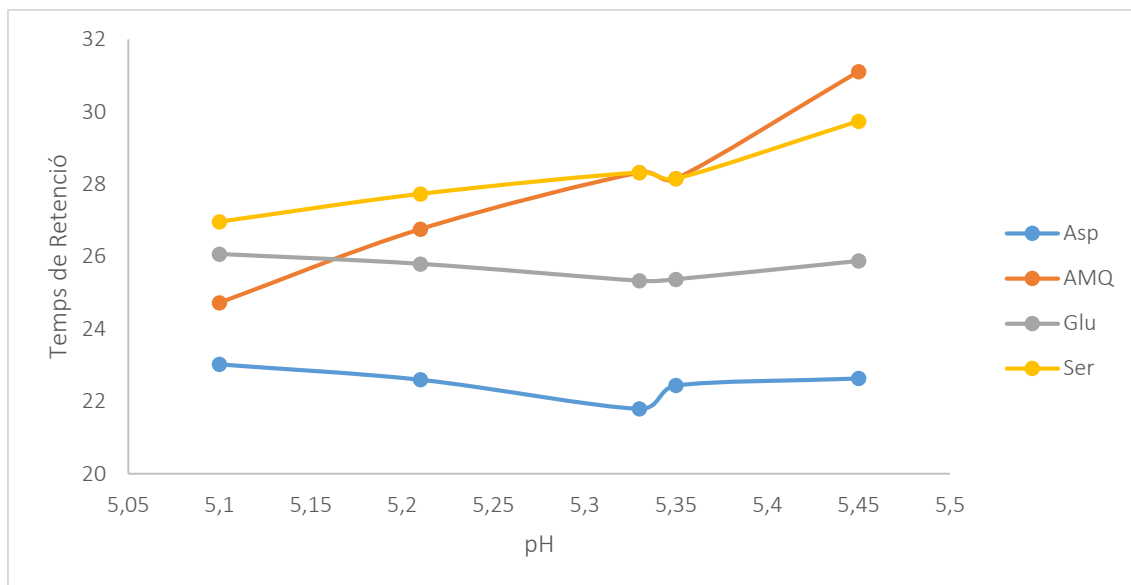


Figura 5. Variació del temps de retenció dels aminoàcids més polars (Asp, Glu i Ser) i de l'AMQ respecte la variació del pH.

Com es pot observar en la Figura 6, l'asparagina (Asn) surt entre Glu i Ser a les mostres de plasma, pel que és molt important assegurar una bona separació entre aquests tres compostos per poder analitzar adequadament Asn a les mostres. Aquest aminoàcid, a l'igual que la glutamina (Gln) i el triptòfan (Trp), no estan presents als patrons comercials ja que la majoria de determinacions es realitzen sobre productes resultants de la hidròlisi àcida de mostres de proteïnes. Aquest procés comporta la degradació d'Asn a Asp, de Gln a Glu i la degradació del Trp, pel que no es poden determinar en aquests casos, però si que son compostos analitzables quan s'analitzen els aminoàcids lliures en plasma.

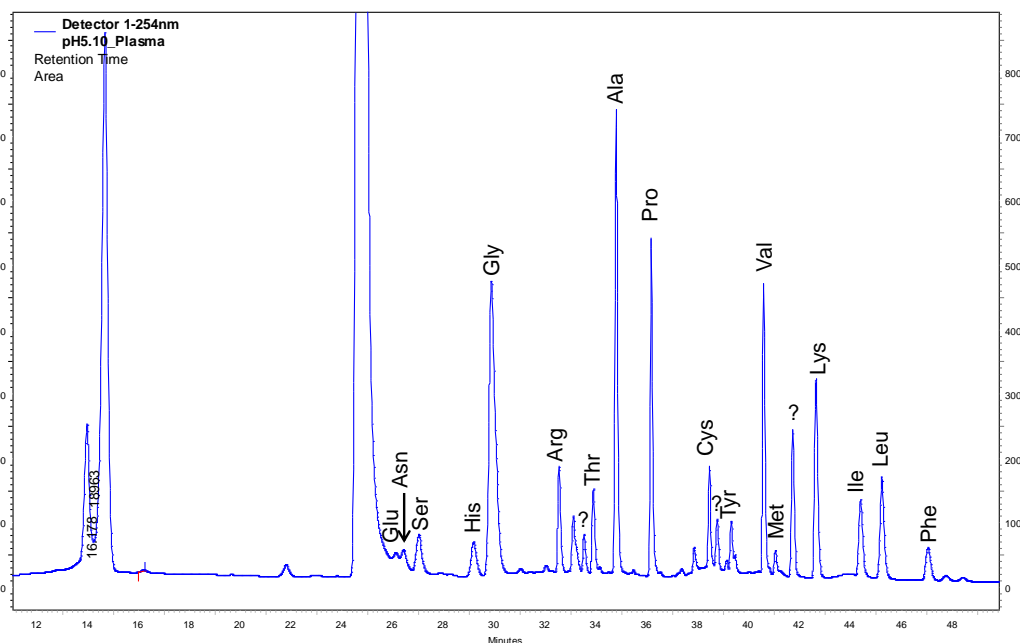


Figura 6. Cromatograma d'una mostra de plasma amb el pH de la fase mòbil ajustat a 5.10

Els resultats obtinguts indiquen que cal un pH igual o superior a 5.3 per separar adequadament Glu, Asn i Ser. A valors de pH al voltant de 5.3-5.4, l'excés d'AMQ coelueix amb el pic de Ser, mentre que a partir de pH=5.4, l'excés de reactiu coelueix amb His i Gly. Un altre efecte observat és que, en general, a mesura que s'incrementa el pH de la fase mòbil s'observa una disminució a la resolució entre dos parells de pics, el parell Thr-NH₃ i el parell Cys-Tyr. En el primer cas, els dos compostos coelueixen totalment a pH=5.45, mentre que el cas de Cys-Tyr arriben a coeluir a pH superiors a 5.45.

Aquests resultats indiquen que no és possible obtenir unes condicions de pH que permetin separar adequadament tots els aminoàcids entre ells i de l'excés de reactiu derivatitzant, pel que es fa necessari determinar unes condicions de compromís que permetin analitzar el màxim de compostos. Tenint en compte el major interès per a la determinació de Glu i l'efecte negatiu d'un increment excessiu en els temps d'anàlisi total i en la resolució de diferents parells de compostos es decideix que el pH que s'haurà d'utilitzar per a la determinació d'aminoàcids ha d'estar comprès en l'interval de pH 5.35 – 5.40. Per aquests motius el pH emprat per a la separació dels aminoàcids és pH 5.38. En aquestes condicions l'AMQ només interfereix amb Ser i els pics dels altres aminoàcids es poden diferenciar correctament (Figura 7), així com els diferents compostos desconeguts que apareixen a les mostres.

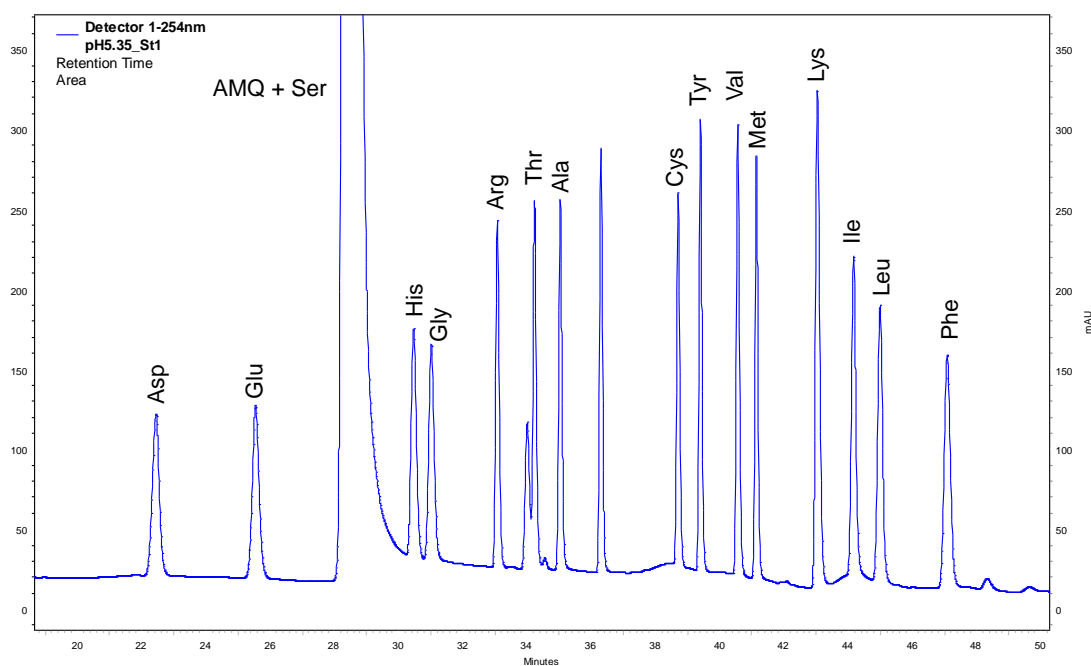


Figura 7. Cromatograma obtingut d'un estàndard en les condicions òptimes per a la separació cromatogràfica (pH fase mòbil A 5.38)

Quantificació dels aminoàcids presents en el plasma

La quantificació dels aminoàcids lliures es va dur a terme mitjançant una corba de calibració, a partir dels estàndards que es van preparar a diferents concentracions. L'interval que es va utilitzar està comprès entre els 50-600 µM, ja que és la concentració on s'espera trobar els aminoàcids presents en el plasma en estat natural (Haldeman-Englert, 2013).

Les mostres analitzades, corresponen a pacients que se'ls hi ha diagnosticat ictus isquèmic amb menys de 4 hores d'evolució. Se'ls ha fet un seguit d'extraccions sanguínies just abans de subministrar el tractament rt-PA i una vegada transcorregudes 2, 6, 24 i 72 hores des del tractament.

A totes les mostres s'han detectat els 20 aminoàcids naturals a més de diferents compostos desconeguts. Tenint en compte la dissolució patró utilitzada, les quantitats detectades i les coelucions que han tingut lloc, només s'han pogut quantificar 15 dels aminoàcids naturals. L'estàndard comercial utilitzat conté 17 aminoàcids i, per tant, només es pot fer la corba de calibració d'aquests 17 compostos. L'asparagina s'ha detectat en totes les mostres, però no es pot quantificar ja que la concentració a totes les mostres es troba a nivells per sota del límit de quantificació del mètode. Com ja s'ha indicat amb anterioritat, la Ser no es determina ja que coelueix amb l'excés de reactiu al fer la detecció per UV.

S'ha observat que la glicina coelueix amb la glutamina, aquest fet comporta que la glicina analitzada presenti una concentració major a la real, el que seria un motiu per no fer la quantificació corresponent. No obstant, diferents estudis (Hazell, 2007; Guevara, 2004) indiquen que la glicina és un co-activador dels receptors de NMDA, per tant quan es produeix un accident cerebrovascular augmenta la concentració d'aquest aminoàcid (Castillo, 2001). Per això es realitza la seva quantificació i, assumint que la glutamina no ha de ser afectada pel subministrament del tractament, si es detecten variacions per aquest pic s'associaran a una variació en el contingut de glicina.

Anàlisi estadístic

La hipòtesi inicial és que els pacients tractats amb rt-PA poden patir una variació de la concentració d'alguns aminoàcids lliures presents en el plasma en funció del temps, especialment en el cas del glutamat. Per a tots els assajos estadístics realitzats en aquest estudi s'ha agafat com a nivell de significació $\alpha=0.05$.

Per saber quin test estadístic s'ha d'aplicar, primerament s'ha de comprovar si la distribució que segueixen les dades és normal. S'ha realitzat el test de normalitat de Shapiro-Wilk. Els resultats obtinguts són que únicament la tirosina i la lisina segueixen una distribució normal a les mostres avaluades ($p>0.05$). Tota la resta d'aminoàcids presenten una distribució no normal als diferents temps estudiats. Per aquest motiu, els resultats s'han analitzat utilitzant el test no paramètric de Kruskal-Wallis, que és equivalent a l'ANOVA unifactorial, però obviant el supòsit de normalitat.

Els resultats obtinguts són que els p-valor per als aminoàcids glutamat, glicina, histidina, treonina, alanina, prolina i cisteïna són superiors a 0.05. Per tant, no hi ha cap diferència significativa per als nivells d'aquests aminoàcids als diferents temps avaluats. En canvi, per l'arginina, tirosina, valina, metionina, lisina, isoleucina, leucina i fenilalanina, els p-valor són inferiors a 0.05. Per aquests aminoàcids si que hi ha una diferència significativa a algun dels temps estudiats.

Per saber a quin o quins temps es produeixen les diferències, s'ha realitzat el test post-hoc de Tukey. En general, s'ha observat que el temps al que hi ha una variació significativa dels nivells d'aminoàcid és a les 72h, és a dir, que la concentració dels aminoàcids durant les primeres 24 hores és constant, però s'incrementa a les 72 hores. L'únic aminoàcid que ha donat un comportament diferent ha estat l'arginina que sofreix un increment significatiu únicament a les 2 hores.

Cal avaluar amb més detall els resultats obtinguts per al glutamat, la glicina i l'arginina, ja que estan implicats en el procés de citotoxicitat que es produeix durant un accident cerebrovascular.

Els resultats obtinguts mostren que tant el glutamat ($p= 0.333$) com la glicina ($p= 0.137$) no mostren cap variació significativa en els seus nivells als diferents temps avaluats ($p>0.05$) (Figura 8 i 9). Tots els estudis realitzats (Tcherkas et al., 2001; Castillo, 2001) han mostrat un increment significatiu d'aquests dos aminoàcids, sobretot en el cas del glutamat, amb el temps una vegada es sofreix un ictus. No obstant, tots els estudis s'han portat a terme sobre pacients que no han rebut cap tractament, per avaluar el comportament d'aquests compostos amb l'evolució de la malaltia. Aquest estudi és el primer on s'avalua el nivell d'aminoàcids en pacients amb ictus després de subministrar el tractament rt-PA. Els resultats obtinguts són molt significatius ja que al no haver observat cap variació indica que el tractament ha tingut un efecte positiu sobre el comportament d'aquests aminoàcids, ja que ha inhibit el seu alliberament, disminuint la seva toxicitat.

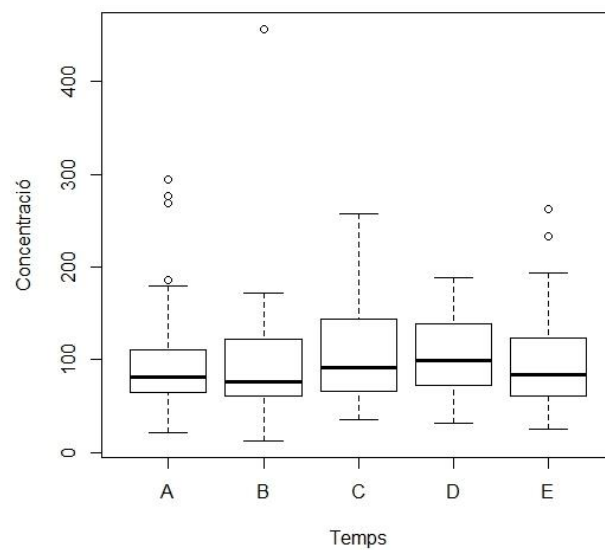


Figura 8. Representa la variació concentració del glutamat en funció del temps on A=0h, B=2h, C=6h, D=24h i E=72h. La concentració està mesurada en μM .

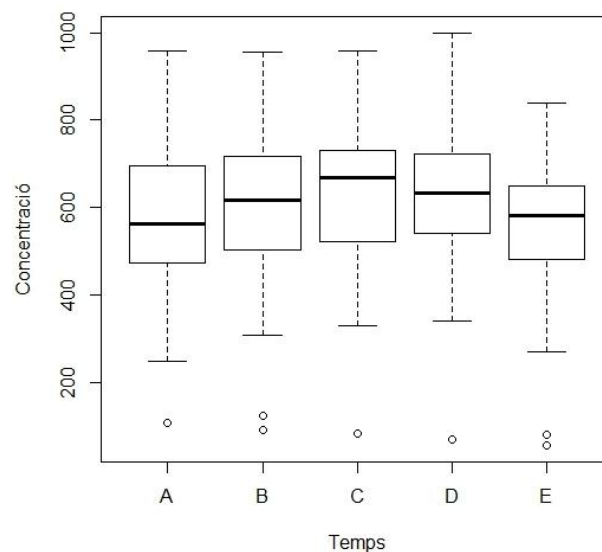


Figura 9. Representa la variació i de la glicina en funció del temps on A=0h, B=2h, C=6h, D=24h i E=72h. La concentració està mesurada en μM .

En el cas de l'arginina ($p=5,45e^{-13}$), els resultats obtinguts al realitzar el tets de Tukey mostren que les mitjanes de 0, 6, 24 i 72h són equivalents entre elles, mentre que els resultats obtinguts a 2h son significativament superiors. Aquest resultat indica que la concentració de l'arginina ha augmentat a les 2h, però després es torna a estabilitzar (Figura 10). Aquest aminoàcid està relacionat amb la formació de radicals lliures i participa a la síntesi d'òxid nítric (NO) a l'endoteli vascular. L'increment de Arg a les primeres hores pot estar relacionat a la producció d'un increment de NO per incrementar les defenses o regular la variació de pressió sanguínia que es pot produir al dissoldre el coàgul.

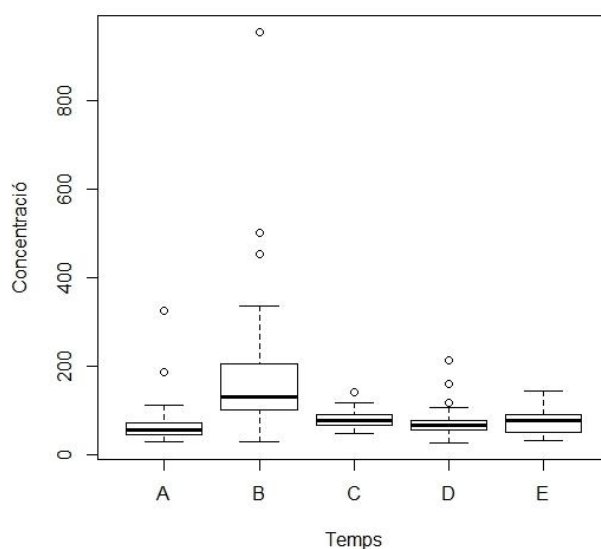


Figura 10. Representa la variació concentració de l'arginina en funció del temps on A=0h, B=2h, C=6h, D=24h i E=72h. La concentració està mesurada en μM .

En la següent taula es mostren els valors dels estadístics obtinguts a partir de l'anàlisi de la concentració dels diferents aminoàcids en funció del temps.

Taula 2. Estadístics obtinguts per als 15 aminoàcids quantificats. Per a la variable corresponent al temps 0h la $n=40$; 2h $n=39$; 6h $n=35$; 24h $n=39$ i 72h $n=38$. La concentració està expressada en μM . (sd = desviació estàndard)

Aminoàcids	Temps	Mitjana	Mediana	sd	Mínim	Màxim
Glutamat	0h	98	81	62	22	294
	2h	95	76	70	13	456
	6h	102	92	50	36	257
	24h	107	99	43	32	188
	72h	98	84	55	25	262
Histidina	0h	55	53	12	30	83
	2h	62	57	21	28	152
	6h	57	56	14	34	95
	24h	57	53	14	34	100
Glicina	0h	588	563	182	107	959
	2h	602	617	174	93	955
	6h	631	669	168	82	957
	24h	633	636	168	69	999
	72h	553	582	167	57	838

Taula 2 (continuació). Estadístics obtinguts per als 15 aminoàcids quantificats. Per a la variable corresponent al temps 0h la n=40; 2h n=39; 6h n=35; 24h n=39 i 72h n=38. La concentració està expressada en μM . (sd = desviació estàndard)

Aminoàcids	Temps	Mitjana	Mediana	sd	Mínim	Màxim
Arginina	0h	67	54	51	12	324
	2h	260	132	494	28	3102
	6h	84	76	32	47	231
	24h	72	67	33	27	211
	72h	71	76	27	30	144
Treonina	0h	99	93	33	32	178
	2h	98	93	25	60	161
	6h	93	92	25	46	159
	24h	100	99	29	33	162
	72h	113	114	36	51	203
Alanina	0h	311	297	126	101	126
	2h	290	289	106	90	616
	6h	303	297	123	42	686
	24h	72	67	34	27	211
	72h	283	279	97	94	465
Prolina	0h	185	174	68	66	114
	2h	204	184	204	109	552
	6h	170	170	48	89	299
	24h	167	149	17	74	350
	72h	171	166	57	69	286
Cisteïna	0h	7	4	6	1	18
	2h	9	5	9	1	33
	6h	10	7	10	1	40
	24h	9	6	8	1	30
	72h	11	6	13	0	52
Tirosina	0h	59	55	22	6	117
	2h	59	60	21	5	109
	6h	55	55	15	28	84
	24h	62	60	22	5	101
	72h	70	72	20	26	112
Valina	0h	191	180	49	114	345
	2h	204	196	47	110	320
	6h	201	209	45	103	303
	24h	205	200	53	132	335
	72h	243	243	64	109	392
Metionina	0h	19	16	12	5	77
	2h	26	19	21	8	130
	6h	19	20	6	6	30
	24h	22	22	9	8	43
	72h	24	24	9	9	48

Taula 2 (continuació). Estadístics obtinguts per als 15 aminoàcids quantificats. Per a la variable corresponent al temps 0h la n=40; 2h n=39; 6h n=35; 24h n=39 i 72h n=38. La concentració està expressada en μM . (sd = desviació estàndard)

Aminoàcids	Temps	Mitjana	Mediana	sd	Mínim	Màxim
Lisina	0h	132	124	71	63	137
	2h	167	155	67	71	328
	6h	134	133	41	63	248
	24h	151	135	51	63	311
	72h	156	154	52	53	242
Leucina	0h	110	102	38	65	240
	2h	118	112	33	64	229
	6h	116	114	30	64	185
	24h	125	116	41	59	227
	72h	147	144	47	63	234
Fenilalanina	0h	50	48	16	38	90
	2h	55	53	19	30	130
	6h	55	52	14	31	88
	24h	58	59	15	34	100
	72h	65	64	18	25	118

Discussió

L'ictus és la segona causa de mort a nivell mundial. Quan es produeix un accident cerebrovascular, el temps és un element indispensable per tal de minimitzar el dany en l'àrea on s'ha produït l'infart. Un període de temps prolongat sense arribada d'oxigen i glucosa a les neurones pot arribar a produir la mort cel·lular.

La mort neuronal és la última etapa de l'ictus. Abans d'arribar a aquest estadi, les cèl·lules es troben en un estat anomenat penombra isquèmica, on pateixen una sèrie de canvis metabòlics que afavoreixen la neurotoxicitat. El glutamat, conjuntament amb altres components, juga un paper molt important en la citotoxicitat. En condicions normals, el glutamat és un neurotransmissor excitador que és constantment reciclat, però en un accident cerebrovascular no es recicla correctament i acaba produint danys neuronals.

Diferents estudis (Nishizawa, 2001; Tcherkas et al., 2001; Hazell, 2007 i Castillo, 2001), han demostrat la implicació d'altres aminoàcids com la glicina i l'arginina en l'ictus. La glicina es tracta d'un co-activador dels receptors de NMDA (Castillo, 2001; Guevara 2004). S'ha observat que durant un accident cerebrovascular la concentració d'aquest aminoàcid augmenta (Tcherkas et al., 2001), produint una major estimulació del receptor i afavorint a la citotoxicitat.

En condicions normals, el calci activa la formació d'òxid nítric (NO) com a neurotransmissor (Eliasson et al., 1999; Neumar, 2000). Per a la formació de l'òxid nítric, es requereix de l'arginina, ja que aquest aminoàcid activa l'òxid nítric sintetasa que és el precursor del NO. Quan es produeix un ictus isquèmic, el glutamat afavoreix l'entrada de calci a l'interior cel·lular i, per tant, augmenta la concentració d'arginina (Tcherkas et al., 2001).

En els estudis (Tcherkas et al., 2001) on s'ha comparat la concentració dels aminoàcids de pacients que han patit un accident isquèmic cerebral (sense el subministrament del tractament) amb la concentració dels aminoàcids en persones sanes, s'ha observat que la concentració del glutamat, la glicina i l'arginina va augmentant de manera progressiva amb el temps.

En l'estudi realitzat, s'han analitzat i quantificat aminoàcids lliures, presents en el plasma de pacients que han patit un ictus i se'ls hi ha subministrat el tractament (rt-PA). Els resultats obtinguts, indiquen que el tractament manté la concentració estable de certs aminoàcids incloent el glutamat i la glicina. Per tant, el tractament té un efecte significatiu en la concentració dels aminoàcids. De no ser així, els resultats indicarien un augment progressiu dels nivells de glutamat i glicina amb el pas del temps. En el cas de l'arginina, també s'ha observat un efecte del tractament, ja que la concentració augmenta a 2 hores, però es torna a estabilitzar al cap de 72 hores, ja que es torna al nivell inicial (0 hores).

En els resultats obtinguts, s'ha pogut observar que els aminoàcids de caràcter més hidrofòbic, és a dir tirosina, valina, metionina, lisina, isoleucina, leucina i fenilalanina mantenen una concentració equivalent, excepte a 72 hores on s'observa un increment lleugerament significatiu. Al no haver estudis similars, no s'ha trobat informació on poder contrastar els resultats obtinguts.

Conclusions

The conclusions obtained from this study are:

- The pH affects the chromatographic elution of the amino acids. 20 amino acids and various unknown compounds were detected in plasma samples. In order to avoid the overlapping of the samples and to perform an optimized quantification, a pH of 5.38 has been used.
- rt-PA treatment has a significant effect on the concentration of certain amino acids like glutamate, glycine and arginine, due to the constant concentration level maintenance.
- rt-PA treatment increases the concentration of hydrophobic amino acids after 72 hours.

Bibliografía

- Cromatografía, T., Alta, D. E. L. D. E., & Disponibles, C. Y. E. (n.d.). Tema 4. cromatografía de líquidos de alta resolución 4.0., 0–31.
- Eliasson, M. J. L., Huang, Z., Ferrante, R. J., Sasamata, M., Molliver, M. E., Snyder, S. H., & Moskowitz, M. A. (1999). Neuronal Nitric Oxide Synthase Activation and Peroxynitrite Formation in Ischemic Stroke Linked to Neural Damage, *19*(14), 5910–5918.
- Fernández-gómez, F. J., Hernández, F., & Argandoña, L. (2008a). Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo, *47*(5), 253–260.
- Fernández-gómez, F. J., Hernández, F., & Argandoña, L. (2008b). Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo, *47*(5), 253–260.
- Hazell, A. S. (2007). Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochemistry International*, *50*(7-8), 941–53.
doi:10.1016/j.neuint.2007.04.026
- Jin, R., Yang, G., & Li, G. (2010). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, *87*(5), 779–89. doi:10.1189/jlb.1109766
- Neumar, R. W. (2000). Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Annals of Emergency Medicine*, *36*(5), 483–506. doi:10.1067/mem.2000.110995
- Nishizawa, Y. (2001). Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sciences*, *69*(4), 369–381. doi:10.1016/S0024-3205(01)01142-0
- Tcherkas, Y. V., & Denisenko, a. D. (2001). Simultaneous determination of several amino acids, including homocysteine, cysteine and glutamic acid, in human plasma by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, *913*(1-2), 309–313. doi:10.1016/S0021-9673(00)01201-2
- Troke, S. T. S., & Roup, S. T. G. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke, *333*(24).
- Vicens, R. (2011). Análisis de Aminoácidos en Plasma Humano por HPLC-UV / Fluorescencia.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., & Ahren, G. K. (2002). Bioquímica. (3ª Edició). Madrid, Espanya Pearson Educación. ISBN: 84-7829-053-2.
- Lehninger, A. L. (1995). Bioquímica. (2ª Edició). Barcelona, Espanya. Omega, S.A. ISBN: 84-282-0211-7
- Manz, A., Pamme, N., & Lossifidis, D. (2004). *Bioanalytical Chemistry: Biomolecules* (1ª Edició). Londres: Imperial College Press.
- Guevara, M., Rodríguez, R., Álvarez, A., Riaño, A., & Rodríguez, P. (2004) *Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica* http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol43_4_04/med08404.htm [Consultat: 3 de Maig del 2015]

- Cohen, S. A & Michaud, D. P. (1993) Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hidroxisuccinimidyl Carbamate, and its Applications for the Analysis of Hidrolysate Aminoacids via HPLC". *Analitycal Biochemistry* 1993, 211, 279-287.
- Vandenberg, R.J., Renae M. (2013). Ryan Physiological Reviews Published 1 October 2013 Vol. 93 no. 4, 1621-1657 DOI: 10.1152/physrev.00007.201 <http://physrev.physiology.org/content/93/4/1621> [Consultat: 3 de Maig del 2015]
- González, J. M, (n.d.) *Aminoácidos y Proteínas* <http://www.ehu.eus/biomoleculas/index.htm> [Consultat: 3 de Maig del 2015]
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M.J., Cacho, J. & Ferreira, V. (2003). Amino Acid Determination in Grape Juices and Wines by HPLC using a Modification of the 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) Method. *Chromatographia* 2003, 58, 29-35
- Haldeman-Englert, C. (2013) A.D.A.M.: *Aminoácidos plasmáticos* <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003361.htm> [Consultat 22 de Maig del 2015]
- Castillo, J. (2001). Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral. *Neuro-Psiquiatría* Diciembre 2001 Vol. 64 no. 4, 354-381 .