



9 300627
Dej

UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA UNAM

PRUEBA CROMATOGRAFICA PARA LA DETECCION
DE AMINOACIDOPATIAS EN UN TAMIZ NEONATAL.
UNA TECNICA UTILIZANDO SANGRE TOTAL
COLECTADA EN PAPEL FILTRO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

ROSALVA MINERVA CANO VALENZUELA

MEXICO, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE
=====

	pág.
ANTECEDENTES	1
OBJETIVOS	3
CAPITULO I. INTRODUCCION	4
CAPITULO II. GENERALIDADES	
II.1 ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO	6
II.2 AMINOACIDOPATIAS	8
II.3 TAMIZ GENETICO	17
II.4 METODOS PARA ANALISIS DE AMINOACIDOPATIAS .	20
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL	
III.1 OBTENCION DE LAS MUESTRAS, TECNICAS Y SUGERENCIAS	23
CAPITULO IV. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	38
CAPITULO V. CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFIA	53

ANTECEDENTES.

Es importante detectar en los primeros días de vida las aminoacidopatías previniendo las manifestaciones clínicas, - frecuentemente graves e irreversibles y evitar el retraso -- mental procediendo a la confirmación del diagnóstico en los casos detectados y posteriormente establecer el tratamiento, (12,21).

Ha sido un procedimiento de rutina en la mayor parte de los países desarrollados en los últimos años. En Europa se realizan en países como: Alemania, Noruega, Suecia, Finlandia, Gran Bretaña, Austria, etc. En Asia se lleva a cabo - en Japón, Nueva Zelanda, etc. En América se realiza en Estados Unidos Americanos, Canadá y Brasil (43).

España a partir de 1979 por medio de un convenio al -- Plan Nacional entre 1980 y 1981 amplió tales programas en - gran parte del país, utilizando la cromatografía en capa fi na en sangre.

El primer programa de detección precoz de aminoacidopa tías en México, se inició en junio de 1975 y duró hasta -- agosto de 1976. Se realizó bajo la dirección del Dr. Anto nio Velázquez (investigador del Instituto de Investigacio-- nes Biomédicas, UNAM) en colaboración con la Dirección Gene ral de Atención Médica Materno-Infantil y la entonces Secre taría de Salubridad Y Asistencia. Este programa denomina do Tamiz Neonatal, se llevó a cabo en seis hospitales de la

Cd. de México, siendo la población en su mayoría mestiza. En tal programa se utilizó la técnica de Inhibición Bacteriana de Guthrie para la detección de Fenilcetonuria, Tirosinemia, Enfermedad de Jarabe de Arce y Homocistinuria (aminoacidopatías de gran importancia) se usó también la cromatografía unidimensional en papel para la detección de otras aminoacidopatías en orina (49).

OBJETIVO GENERAL.

Montar la técnica cromatográfica más adecuada para la -
detección de aminoacidopatías en sangre colectada en papel -
filtro, seleccionando entre la cromatografía en capa fina y -
la cromatografía en papel.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

La cobertura de los siguientes objetivos, serán los cri-
terios que ayudarán a seleccionar la técnica adecuada.

- Obtener la mejor separación en los aminoácidos de la sangre en el cromatograma.
- Obtener la técnica más sensible, que nos ayude a detectar concentraciones anormales de aminoácidos en rangos de mínima diferencia.
- Obtener los mejores resultados en el menor tiempo posible.

OBJETIVOS ESPECIFICOS EN LA TECNICA SELECCIONADA.

- Conocer la posición de cada aminoácido en el cro-
matograma.
- Diferenciar e identificar cada aminoácido en una mez-
cla de estándares de aminoácidos en el cromatograma.
- Identificar cada aminoácido en sangre normal.
- Identificar cada aminoácido en sangre con concentra-
ciones de aminoácidos anormales.

CAPITULO I.

INTRODUCCION

Los trastornos del metabolismo de los aminoácidos que se presentan en el hombre son en su mayor parte enfermedades "raras" y como tales es muy difícil que sean encontradas por la mayor parte de los médicos. Su frecuencia aparentemente baja, refleja la ausencia, solo hasta muy recientemente, de técnicas automatizadas para la identificación y estimación cuantitativa de los aminoácidos individuales en la sangre, orina y líquido cefalorraquídeo.

Las técnicas hasta ahora introducidas en grandes poblaciones, respecto a aminoácidos normales o de niveles anormales de los aminoácidos comunes, pueden conducir al reconocimiento más frecuente de estos trastornos.

Los padecimientos son descubiertos más frecuentemente durante la lactancia, a menudo resultan mortales a una edad muy temprana y con frecuencia dan por resultado lesiones irreversibles si no son tratados. Su identificación precoz y el inicio rápido del tratamiento apropiado, si se dispone de él, son esenciales. Puesto que varía de las enzimas que intervienen son demostrables en cultivos de células del líquido amniótico, el diagnóstico prepartum de estos padecimientos es una posibilidad. Aunque el tratamiento ordinario consiste primordialmente en dar dietas bajas en los aminoácidos cuyo catabolismo es defectuoso, algún día se dispondrá de un tratamiento más efectivo.

La relación del DNA con las enzimas permite suponer que alterando a aquél se modifica la enzima y, de esta manera, se produce el bloqueo específico en un paso del metabolismo de una sustancia.

La posibilidad de que la síntesis de cada enzima esté condicionada por una molécula de desoxirribonucleoproteína, que desde el punto de vista funcional es el equivalente de un gene, es concepto conocido como la hipótesis de "un gene-una enzima". A la falta de un gene corresponde la falta de la enzima correspondiente; al deterioro del gene, la modificación de la enzima. La enzima modificada o mutante puede poseer eficiencia catalítica alterada o capacidad alterada para unirse con un regulador alostérico de su actividad catalítica.

CAPITULO II.

GENERALIDADES

II.1 ERRORES INNATOS DEL
METABOLISMO

En los organismos vivos las reacciones químicas están acopladas de tal forma que constituyen las diferentes vías metabólicas (25).

Un defecto en la actividad de una enzima o de un proceso de transporte traerá como consecuencia un bloqueo en el flujo de metabolitos por la vía metabólica. Este tipo de defectos son heredados en forma monogénica o mendeliana (esto es, cuando uno de los progenitores transmite al descendiente (s) dicho defecto por medio de un gen) (43), y traen como consecuencia el bloqueo metabólico, en donde hay acumulación del sustrato y formación insuficiente del producto. Los cambios en las concentraciones de metabolitos en la vía afectada pueden producir a su vez modificaciones en la actividad de enzimas pertenecientes a otras vías diferentes. Dependiendo de la naturaleza y magnitud de estos cambios bioquímicos, serán las modificaciones fenotípicas que frecuentemente constituirán una enfermedad (43).

En las últimas décadas se ha señalado la importancia de la detección temprana de algunos errores congénitos del metabolismo que pueden producir deterioro mental, ya que su diagnóstico, cuando se hace en los primeros días o meses de vida pudiera prevenir o al menos reducir el número de deficientes mentales.

Los errores del metabolismo van a alterar el estado nutricional del individuo, ya que las deficiencias enzimáticas tienen como consecuencia una utilización deficiente de diversos nutrimentos tales como aminoácidos o azúcares (principal

mente) dando lugar a alteraciones en el crecimiento y el desarrollo.

Por lo tanto, como ya se hizo mención, el tratamiento va a ser esencialmente dietético. En algunos casos consiste en proporcionar una dieta en la cual se mantenga restringido el sustrato que se acumula en el organismo debido al bloqueo y se suplementan aquellos metabolitos deficientes. En otros, el tratamiento consiste en administrar cantidades suprafarmacológicas de derivados vitamínicos que funcionan como coenzimas, esperando que al encontrarse en exceso promueva la activación de la enzima defectuosa.

Para que los pacientes con errores innatos del metabolismo cubran el requerimiento de todos los nutrimentos, logren un desarrollo adecuado y eviten el catabolismo de compuestos que puedan precipitar de nuevo su sintomatología es necesario en algunas ocasiones, utilizar alimentos sintéticos que contengan cantidades limitadas del nutrimento elevado en la vía metabólica bloqueada. La dieta debe completarse con alimentos naturales para evitar deficiencias dietéticas.

11.2 AMINOACIDOPATIAS

A la elevación anormal de la concentración de un aminoácido se le ha denominado: aminoacidopatía.

Las anomalías en el metabolismo de los aminoácidos son generalmente identificadas en el laboratorio, examinando los fluidos corporales.

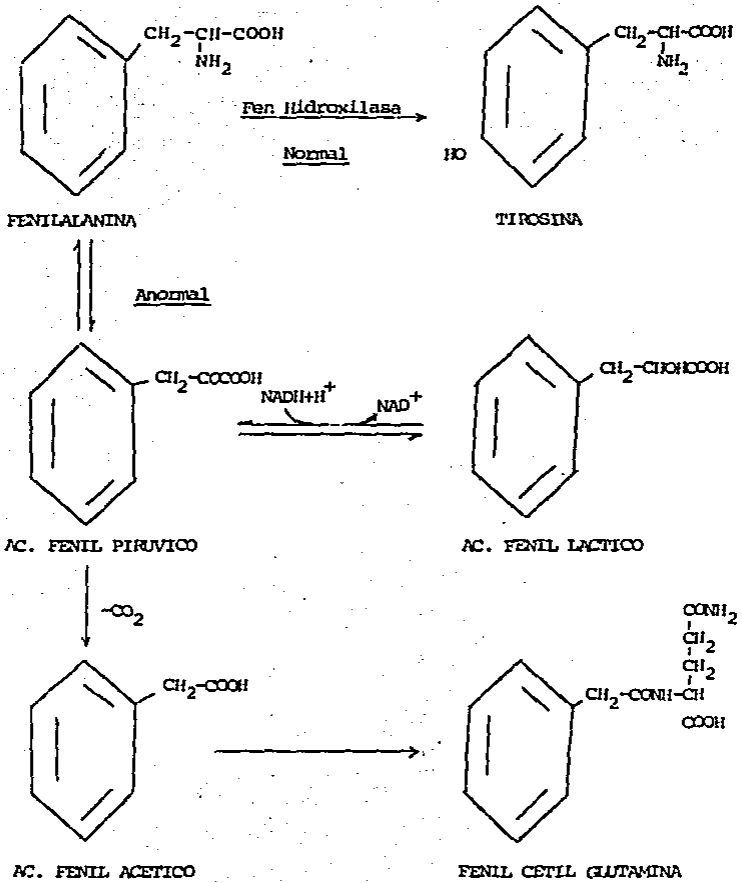
Dentro de las aminoacidopatías se destacan por su importancia: la oligofrenia fenilpirúvica ó fenilcetonuria, - la enfermedad de jarabe de arce y la homocistinuria; son enfermedades moleculares hereditarias evitables (13).

A continuación se da una breve descripción de estas aminoacidopatías que además de importantes son las más frecuentes:

A. Fenilcetonuria. La fenilcetonuria es un error innato del metabolismo causado por la deficiente actividad de la enzima: fenilalanina hidroxilasa, que interviene en la conversión de fenilalanina en tirosina (fig. 1).

El paciente es, por lo tanto, incapaz de convertir la fenilalanina en tirosina y, como resultado de esto, se producen catabolitos alternativos de la fenilalanina, éstos incluyen al ácido fenilpirúvico que es un producto de la desaminación de la fenilalanina; al ácido fenil-láctico, producto de la reducción del ácido fenilpirúvico; y el ácido fenil-acético, producto de la descarboxilación y oxidación del ácido fenilpirúvico. Mucho del fenilacetato se conjuga en el hígado con la glutamina y es excretado en la orina

FIG. 1



como fenilacetilglutamina. Debido a la presencia del cetoácido fenil pirúvico, en la orina, esta enfermedad recibió el nombre de fenilcetonuria (4,43).

La incidencia de la fenilcetonuria varía según la población estudiada; en los Estados Unidos Americanos, se calcula alrededor de 1:15,000 nacidos vivos (23), en Irlanda y Escocia 1:6,000, en personas de raza negra y judíos ashkanazi es mucho más alta (4). Aunque en México se desconoce, la incidencia no se cree sea mayor que en E.U.A. (49).

Clínicamente, los pacientes se observan normales al nacimiento, aunque en algunos estudios se describe: olor suígeris y vómitos de repetición en los primeros días de vida postnatal (33). El síntoma clínico más frecuente, es el retraso mental que se hace aparente en los primeros meses de vida y generalmente es profundo, el 64% de los pacientes presentan complicaciones neurológicas, sobre todo convulsiones y son comunes las alteraciones de la conducta como hiperkinesia y autismo (4).

Con el fin de facilitar el tratamiento se han creado productos especiales elaborados a base de hidrolizados proteínicos, o bien, a partir de mezclas de aminoácidos excluyendo la fenilalanina y complementados con otros nutrientes como azúcares, lípidos, vitaminas y minerales, los cuales contribuyen a cubrir los requerimientos mínimos de los pacientes.

B. Enfermedad con orina de jarabe de arce. Como el nombre lo dice, una característica de esta enfermedad, es el color de la orina, que se parece al de la miel de arce o al de la azúcar quemada.

En los individuos afectados, tanto a niveles plasmáticos como urinarios de los aminoácidos de cadena ramificada: leucina, isoleucina y valina, se encuentran grandemente elevados al igual que sus correspondientes alfa-cetoácidos (48).

El defecto bioquímico, es la falta o la gran reducción de la actividad de la alfa-cetoácido descarboxilasa, que cataliza la conversión de los tres alfa-cetoácidos de cadena ramificada en CO_2 y tioésteres del acil-co A (fig. 2).

Como se observa, en el paso número 2, ocurre el bloque metabólico de la enfermedad con orina de jarabe de arce. El mecanismo de toxicidad se desconoce.

Aunque el recién nacido afectado parece normal al principio, los signos característicos de la enfermedad son evidentes hacia el fin de la primera semana de vida extrauterina, el lactante es difícil de alimentar y puede vomitar entrando en letargo en grado importante. En los niños que sobreviven se presenta daño extenso del encéfalo. Sin tratamiento, la muerte sucede al final del primer año de vida (48).

El paciente puede estar sujeto a una dieta en la cual las proteínas sean aportadas sólo por una mezcla de aminoácidos purificados, de los cuales se omiten la leucina, iso-

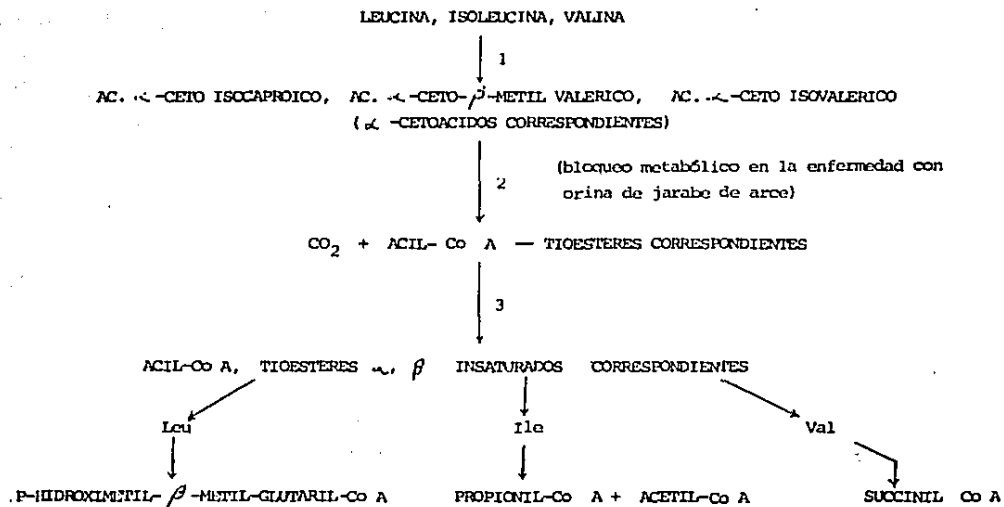


FIG. 2

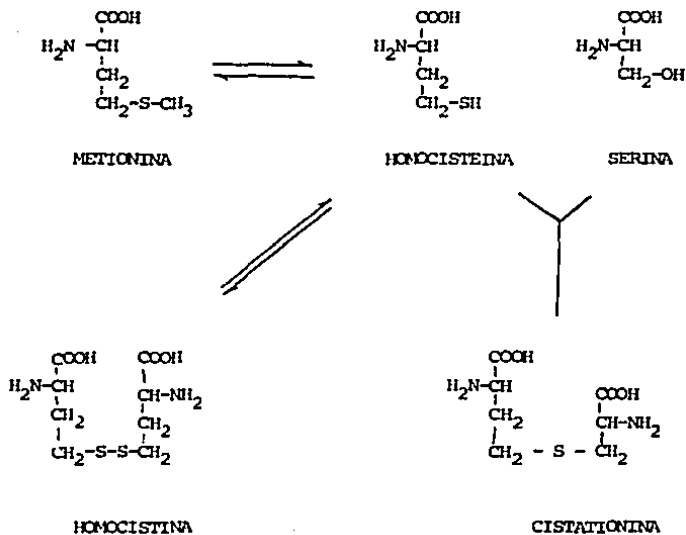
leucina y valina.

C. Homocistinuria. Es un defecto hereditario del catabolismo de la metionina. Tiene una frecuencia estimada de 1: 160,000 nacidos vivos en los Estados Unidos Americanos. La enfermedad refleja la baja actividad de la cistationinasintetasa, que trae como consecuencias, la elevación de homocistina y metionina; el tratamiento consiste en la reducción de las concentraciones plasmáticas de metionina y homocistina mediante una dieta hipoprotéica - (baja en metionina principalmente) suplementada con cistina, ya que este aminoácido no se produce cuando se bloquea la unión de la coenzima, es posible que la enzima -- responda a dosis suprafarmacológicas de piridoxina, ya -- que en su forma activa, el fosfato de piridoxal actúa como coenzima de la enzima cistationina sintetasa.

La homocistina es eliminada por la orina y la metionina por el plasma en niveles elevados.

Cuando el bloqueo se presenta a nivel de la enzima NS-(metilen tetrahidrofolato metilen transferasa) la homocistina y las concentraciones de metionina en plasma son bajas. (fig. 3). En estas ocasiones el defecto puede corregirse mediante la administración de dosis suprafarmacológicas de su coenzima la vitamina B12. Dicho padecimiento puede ser dado por absorción o por el metabolismo -- deficiente de la vitamina B12 (43).

FIG. 3



Las manifestaciones clínicas más frecuentes de este error innato del metabolismo son: complicaciones oculares como luxación del cristalino y glaucomas, retraso mental progresivo, alteraciones en el tejido conjuntivo con una apariencia similar al síndrome de Marfan (extremidades largas y deformidades del tórax).

De las aminoacidopatías restantes se pueden observar sus efectos clínicos en el cuadro número 1.

Síndromes Asociados con los Errores Congénitos del Metabolismo:

Trastornos del Metabolismo de los Aminoácidos

<u>Síndrome</u>	<u>Aas. elevados</u>	<u>Bioquímica</u>	<u>Características y tratamiento</u>
Histidemia	histidina	Histidina amoniaco liasa	Lenguaje farfullado, frecuencia variable del retardo mental. Se ha utilizado dieta baja en histidina con resultados dudosos.
Hiperfenilalaninemia	fenilalanina	No se conoce con precisión, en algunos casos, fenilalanina transaminasa.	El paciente puede ser normal. - trátase cuando la concentración de fenilalanina en suero sea superior a 20 mg/100 ml.
Tirosinosis	fenilalanina	Deficiencia transitoria de p-hidroxifenilpirúvico oxidasa.	Falta de crecimiento general; - convulsiones, responde temporalmente a una dieta deficiente en fenilalanina.
Hipervalinemia	valina	No identificada.	Falta de crecimiento, vómitos, - nistagmo.
Hiperlisinemia	lisina	Lisinaclasa, lisinodeshidrogenasa o lisincetoglutamato.	Convulsiones y coma, relacionados con los alimentos proteicos.
Hiperglicinemia	glicina, serina, alanina, ác. glutámico	Deficiencia de glicinaformil FH ₄ transferasa.	Episodios de vómitos con deshidratación severa, acidosis, cetośis, infecciones repetidas y retardo mental.
Aciduria glutámicca	ác. glutámico	Se desconoce.	Cabello escaso, áspero, despigmentado, retardo mental, falta de crecimiento, malformaciones congénitas.
Aciduria de cetoácidos de cadena ramificada	isoleucina, valina, leucina	Descarboxilasa de cetoácidos de cadena ramificada.	Dificultad neonatal para la alimentación, anorexia, convulsiones y otros signos neurológicos. Se observan formas leves, intermitentes y dependientes de la - tiamina.

CUADRO NUM. 1

ref. (43)

11.3 TAMIZ GENETICO

La técnica a montar, formará parte de un programa denominado "tamiz genético de aminoacidopatías en recién nacidos", que se llevará a cabo en un principio en tres hospitales del D. F. :

- Instituto Nacional de Perinatología de la Secretaría de Salud.
- Hospital de la Mujer de la Secretaría de Salud.
- Clínica obstétrica número 4 del IMSS.

en un futuro se generalizará a nivel nacional.

Un tamiz desde el punto de vista médico, es la identificación de una enfermedad o defecto no reconocido, por medio de la aplicación de pruebas, exámenes u otros procedimientos que pueden aplicarse rápidamente. Las pruebas de tamiz separan personas aparentemente sanas que probablemente tienen una enfermedad, de aquellas que no la tienen (50). Puede ser dirigido a toda una población, siendo éste un tamiz masivo, o a un grupo de alto riesgo llamándose tamiz selectivo. El tamiz va a detectar directamente enfermedades establecidas para dirigir así los pacientes al tratamiento.

Tamiz Genético: va a buscar dentro de una población personas con genotipos y fenotipos que se sabe están asociadas con ciertas enfermedades y que éstas pueden ser llevadas a los descendientes, o que pueden producir inicialmente una variante "silenciosa" que en un ambiente particular puede incurrir en un alto riesgo para la aparición de la enfermedad (26).

Para Scriver y colaboradores, los objetivos del tamiz genético son (27):

- Dar oportunidad a la intervención médica para prevenir enfermedades genéticas o minimizar sus efectos.
- Dar oportunidad de brindar consejo genético.
- Reunir datos pertinentes al sistema de salud pública y al conocimiento básico.

Las técnicas de detección en un tamiz deben ser simples, rápidas y económicas, permitiendo en el caso de un resultado positivo actuar lo más oportunamente posible.

Hay varias técnicas que pueden ser aplicadas tanto en grandes como en pequeños hospitales, siendo examinadas miles de muestras de recién nacidos al año. El costo de un programa de tamiz no es excesivo si se considera que el costo total del programa por año es quizás la mitad del costo del mantenimiento de un solo niño en una institución de por vida.

El procedimiento original en un tamiz masivo fué descrito por Guthrie, basándose en un método microbiológico -- utilizando en la detección unicamente de la fenilcetonuria, este procedimiento con algunas modificaciones permite detectar otros aminoácidos.

Posteriormente, Culley y colaboradores, utilizaron la cromatografía para el análisis del suero sin ningún pretratamiento y desproteínización.

Efron y colaboradores (6), desarrollaron una técnica cromatográfica utilizando sangre total, describiendo un pro

cedimiento rutinario para la detección de niveles de concentración bajos y altos de los aminoácidos.

11.4 METODOS PARA ANALISIS

DE AMINOACIDOPATIAS

La variedad que existe de estas técnicas a hecho posible que existan programas de tamiz para las diferentes anormalidades de los aminoácidos. Como resultado de estos estudios han sido descubiertos cerca de 30 errores innatos -- del metabolismo en los que se encuentran anormalidades primarias o secundarias de aminoácidos.

A continuación se describen las técnicas más utilizadas en los programas de tamiz:

1) Pruebas químicas. Muchas de las pruebas químicas para la detección de metabolitos anormales de aminoácidos no son específicas y reaccionan con un gran grupo de sustancias como una prueba de tamiz, dando diferentes colores de reacción, entre éstas tenemos:

Prueba con cloruro férrico
Prueba de 2,4-dinitrofenilhidrazina
Prueba de nitroso naftol
Prueba cianuro-nitroprusiato
Prueba plata-nitroprusiato
Prueba tiosulfato
Prueba obermayer

Estas pruebas tienen un costo elevado por el valor de los reactivos y la preparación de la muestra.

2) Método microbiológico. Guthrie y Susi adaptaron la inhibición de crecimiento microbiológico al tamiz de fe nilcetonuria.

En dicho método se tiene a un microorganismo (B. subtilis) que es inoculado en un medio de agar, al cual se le adiciona un inhibidor del crecimiento. La fenilalanina en altas concentraciones vencerá el efecto inhibitorio y el crecimiento del microorganismo ocurrirá (9), por lo que si se coloca sobre la superficie de agar un disco impregnado con sangre, se puede determinar si la muestra contiene cantidades excesivas de fenilalanina por el tamaño de la zona de crecimiento que se encuentra alrededor del disco (10,28).

Este método puede ser adaptado a la detección de aminoácidos como: leucina, tirosina, metionina, lisina y valina (45).

Las desventajas de este método son (24):

- Poca sensibilidad, por lo que da la posibilidad de obtener falsos negativos.
- Solo se puede, al adaptar la técnica, trabajar con un aminoácido en particular.
- Solo es posible adaptar la técnica a seis aminoácidos.

3) Métodos cromatográficos. Estos métodos son muy utilizados en los programas de tamiz masivos. La cromatografía en capa fina o papel para el análisis de orina se utiliza en algunos países después de tres o cuatro semanas -- del nacimiento para la detección de histidemias, acidurias orgánicas, disulfurias y glucosurias, así como desórdenes del túbulo renal. Hay muchas y diferentes opiniones refe

rentes a que técnica (en capa fina o en papel) es la más adecuada.

Con respecto, a la selección del fluido fisiológico, se deben de tomar en cuenta algunas consideraciones:

- Al trabajar con orina se tienen muchas e importantes desventajas considerando que una prueba de tamiz debe ser rápida y de bajo costo, pues el tiempo tan extenso que se necesita para hacer la prueba a partir del nacimiento, el tiempo de procesado de la orina (desalación) y las múltiples contaminaciones que puede sufrir la muestra a causa de heces; pomadas, cremas y talcos no garantizan resultados confiables -- (15,22).

En muchos países actualmente se lleva a cabo el tamiz con muestras colectadas en papel filtro teniendo como ventajas, la fácil toma de la muestra, la manipulación y las pocas posibilidades de contaminar la muestra evitando el contacto con saliva o sudor (37,45).

CAPITULO III.

PARTE EXPERIMENTAL

III.1 OBTENCION DE LAS MUESTRAS

TECNICAS Y SUGERENCIAS

OBTENCION DE LA MUESTRA.

Este punto se divide en dos partes:

- Preparación de estándares.
- Preparación de sangre con estándares.

A. Preparación de Estándares.

Se prepararon las soluciones estándares de los siguientes aminoácidos:

Alanina	Histidina	Serina
arginina	isoleucina	treonina
ácido aspártico	lisina	tirosina
glicina	leucina	valina
glutamina	metionina	fenilalanina
ácido glutámico		

Reactivos:

aminoácidos
isopropanol
ácido clorhídrico
agua desionizada y bidestilada

1. Se pesan 2 mg de cada aminoácido.
2. Se prepara una solución al 10% de isopropanol y se le adicionan dos gotas de ácido clorhídrico 1N para disolver aquellos aminoácidos insolubles en agua.

Al final se obtiene una concentración de 2 mg/ml que puede ser diluida para obtener concentraciones de 15, 8, 6

y 4 mg/100 ml.

B. Estandarización de la sangre.

La sangre utilizada fué donada por el banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría.

Los cálculos que se siguieron para preparar la sangre estandarizada se basaron en la siguiente fórmula: (47):

$$(V - Vf) \cdot [aa]_g + Vf \cdot [aa]_p = V \cdot [aa]$$

V = volumen a preparar de sangre estandarizada.

Vf = volumen del estandar a añadir a la sangre.

$[aa]_g$ = concentración individual de cada aminoácido en la sangre.

$[aa]_p$ = concentración individual de cada aminoácido (solución estándar).

$[aa]$ = concentración del aminoácido a la que se quiere llegar.

CONCENTRACIONES DE LOS AMINOACIDOS EN SANGRE

niveles normales: medios y altos

	MEDIO (mg%)	ALTO (mg%)
GLICINA	1.78	4.16
ALANINA	2.99	5.89
VALINA	2.50	3.71
METIONINA	0.34	0.59
ISOLEUCINA	0.83	1.28
LEUCINA	1.46	2.30
TIROSINA	0.94	1.58
FENILALANINA	0.88	1.92
LISINA	2.23	3.47
GLUTAMINA	8.30	10.14

Datos proporcionados por el Instituto de Investigaciones
Biomédicas de la UNAM.

CUADRO NUM. 2

Una vez obtenida la sangre estandarizada a las concentraciones deseadas se procedió a aplicar gotas de ésta con pipetas Pasteur en papel filtro watman 3 (este papel es el que se utilizará oficialmente en el programa de tamiz genético para la recolección de sangre).

Estas muestras de sangre colectadas en papel filtro se preservan envueltas en papel aluminio en refrigeración.

Cuando el programa de tamiz genético se lleve a cabo, las muestras de sangre se obtendrán por punción de talón -- aplicando la sangre en una tarjeta de papel filtro (Scheicher y Schuell núm. 903, equivalente al papel filtro watman 3) (22), la cual deberá tener especificados los datos correspondientes al paciente, dichas muestras serán tomadas -- por enfermeras o médicos residentes.

Se tienen proyectados entre 15 o 20 niños tamizados -- diariamente.

Las muestras de sangre se deberán tomar a las 48 horas de nacido el niño, cuando sólo se pierde un 0.3% de -- las aminoacidopatías (14).

Inicialmente se trató de establecer una técnica cromatográfica en capa fina utilizada en el Programa Español para la Detección de Aminoacidopatías (técnica núm. 1), durante dicho montaje se analizaron diversos aspectos que al sufrir un cambio podrían llegar a formar una técnica más eficiente y sensible que la original. Estos cambios realizados pueden resumirse en las cuatro técnicas que a continuación se describen:

TECNICA NUM. 1

Material.

Placas de aluminio con celulosa marca Merck, 20 x 10 cm.
tanques para cromatografía 25 x 15 cm.
charolas de porcelana
barras de vidrio 22 x 2.5 cm
cinta adhesiva (scotch)
ligas gruesas
perforador de discos, 6 mm de diámetro
material común de laboratorio

Reactivos.

Isopropanol	etanol
n-butanol	ninhidrina
acetona	isatina
ácido acético	colidina

Preparación y aplicación de las muestras.

a. Sobre la barra de vidrio se coloca la cinta adhesiva, de manera que la parte del pegamento quede hacia el exterior.

b. En la cinta adhesiva se hacen marcas con una separación entre sí de 1.5 cm.

c. Por otro lado, se perforan las muestras tanto de --sangre como de estándares a aplicar.

d. Estas son colocadas sobre las marcas en la cinta --adhesiva.

e. Enseguida se une la barra de vidrio contra la placa de aluminio y se fijan con la liga gruesa.

Preparación de los tanques para cromatografía y mezclas de solventes. Desarrollo unidimensional.

a. Al primer tanque se le agrega isopropanol al 70% - (100 ml), esperando un corto tiempo para darle oportunidad al tanque de que se sature. Se introduce la placa cromatográfica por un tiempo de 3 minutos.

b. Se separa la placa de vidrio de el folio y se deja evaporar el solvente de ésta un tiempo aproximado de 10 - minutos.

c. Mientras tanto se prepara la mezcla de solventes a utilizar en el sistema unidimensional en las proporciones siguientes:

n-butanol, acetona, ácido acético, agua (35:35:10:20)

se agitan bien y se agregan en un segundo tanque.

d. Se coloca la placa en el segundo tanque comenzando así el sistema unidimensional. Una vez que la mezcla de solventes llegó al tope de la placa, ésta se saca y se evaporan los solventes. Se coloca una vez más la placa en el tanque hasta que los solventes lleguen al tope y luego se evaporan.

El desarrollo del sistema unidimensional dura aproximadamente 2 horas.

Preparación de la solución de tinción.

- a. Se pesan 200 mg de ninhidrina y 100 mg de isatina.
- b. Se mezclan con 100 ml de etanol al 70%, se agita hasta disolver y finalmente se agrega 1 ml de colidina.
- c. Exclusivamente se utilizan para la tinción 10 ml de esta solución, el resto se guarda en frascos de color ámbar para su uso posterior.

Tinción.

- a. Se vierte la solución reveladora (10 ml por placa) en una charola, se sumerge (totalmente) la placa cromatográfica, se saca y se evapora un poco.
- b. Se somete a 120 °C en la estufa por un tiempo de 5 minutos.

Se prosigue a analizar los resultados.

SUGERENCIAS.

1. La barra de vidrio, la cinta adhesiva y la liga --- gruesa son utilizadas para mantener fijas de alguna forma - las muestras a la placa cromatográfica, por esta razón hay- que tener el máximo de cuidado en el manejo de estas piezas, para lo cual se recomienda el uso de guantes de plástico y - alcohol para el desengrasado de la barra de vidrio y ligas, evitando así que sustancias ajenas alteren los resultados.

2. Toda marca que se haga en los cromatogramas debe ha- cerse con lápiz, ésto evitará que ocurran contaminaciones - adicionales que alterarían los resultados. Las marcas de- berán hacerse suavemente para no levantar el recubrimiento- de celulosa.

3. Las muestras se colocan a una distancia entre sí de 1.5 cm para que no ocurran sobreposiciones en los aminoáci- dos de las muestras vecinas.

4. Se debe trabajar dentro de la campana de extracción cuidando que durante la tinción ésta permanezca apagada y - medio cerrada, puesto que los solventes que se utilizan son muy volátiles, de no ser así se corre el riesgo de que los- cromatogramas no queden bien impregnados con dicha solución.

TECNICA NUM. 2

Material.

Placas de aluminio con celulosa Merck 20 x 10 cm.
tanques para cromatografía 25 x 15 cm
charolas de porcelana
perforados de discos, 6 mm de diámetro
material común de laboratorio

Reactivos.

n-butanol	ninhidrina
acetona	isatina
ácido acético	colidina
etanol	

Aplicación de la muestra.

- a. Sobre la placa cromatográfica se hacen marcas con lápiz con una separación entre sí de 1.5 cm.
- b. Se perforan discos exactamente sobre las marcas de lápiz.

Se pasa directamente al desarrollo del sistema unidimensional excluyendo la elución en isopropanol. La mezcla de solventes y el desarrollo del sistema unidimensional son llevados a su realización de la misma forma que se hizo en la técnica número 1.

Preparación de la solución reveladora.

a. Se pesan 2.5 mg de ninhidrina y 0.5 mg de isatina - por cada 10 ml de etanol al 70%.

b. Se agita hasta disolver y se le adiciona 0.1 ml de - colidina por cada 10 ml de etanol.

La tinción de los cromatogramas se lleva a cabo de la - misma forma que en la técnica número 1.

SUGERENCIAS.

1. Se recomienda seguir las sugerencias 2, 3 y 4 de -- la técnica núm. 1.

2. La solución de tinción debe ser preparada con extre - mo cuidado, ya que no basta el uso de guantes puesto que -- las aminas una vez disueltas en los solventes migran a tra-- vés de éstos.

3. Para fijar bien las muestras dentro de las perfora - ciones de la placa, se puede presionar ligeramente con un - dedo enguantado sobre la muestra.

4. Se redujeron las cantidades de ninhidrina e isatina en la preparación de la solución de tinción, ya que las pro - puestas en un principio resultaron excesivas ocasionando -- distorción en los resultados.

TECNICA NUM. 3

Material.

Placas de aluminio con celulosa marca Merck 20 x 10 cm.
tanques para cromatografía 25 x 15 cm.
autoclave
charolas de porcelana
perforador de discos, 6 mm de diámetro
material común de laboratorio

Reactivos.

n-butanol	ninhidrina
acetona	isatina
ácido acético	lutidina

Preparación y aplicación de la muestra..

- a. Las muestras se envuelven en papel filtro individualmente.
- b. Enseguida se someten a autoclave por un tiempo de 3 minutos a 250 °F y 15 lb de presión.
- c. Mientras tanto las placas han sido ya perforadas y los solventes del desarrollo unidimensional preparados.
- d. Los tanques para cromatografía, solventes y sistema unidimensional son preparados y llevados a cabo de la misma forma que en la técnica núm. 1.

Preparación de la solución para revelar.

- a. Se pesan 5 mg de ninhidrina y 1 mg de isatina.
- b. Se disuelven en 20 ml de acetona, se agita hasta disolver y al final se adicionan 0.2 ml de lutidina.

Tinción.

Se lleva a cabo de la misma forma que en la técnica -- número 1.

SUGERENCIAS.

1. Se recomienda seguir las sugerencias 2, 3 y 4 de la técnica núm. 1.
2. Antes de someter las muestras al sistema de autoclave, éstas deberán envolverse individualmente en papel aluminio rotulándose para no confundirlas.

TECNICA NUM. 4

Material.

Papel filtro watman 1 y watman 3
tanques para cromatografía 25 x 30 cm
charolas de porcelana grandes
perforador de discos, 6 mm de diámetro
material común de laboratorio

Reactivos.

Etolol	ninhidrina
n-butanol	isatina
acetona	lutidina
ácido acético	

Preparación y aplicación de las muestras.

- Se recortan hojas de papel filtro de 20 x 20 cm.
- Se hacen marcas sobre el papel filtro a una distancia entre sí de 2.5 cm y se perfora sobre éstas. En los extremos opuestos se atraviesan dos hebras de hilo blanco.
- Por otro lado, se perforan las muestras, posteriormente se aplican sobre las hojas de papel filtro.

Preparación de los tanques para cromatografía y mezcla de solventes.
Desarrollo unidimensional.

- Se impregnan con vaselina las tapas de los tanques.

b. Al primer tanque se le agregan 100 ml de etanol al 70%. Se introduce el papel filtro manteniendolo en posición vertical por medio de los hilos dentro del tanque por un tiempo de 3 minutos.

c. Se saca el cromatograma y se deja evaporar el solvente, aproximadamente 5 minutos.

d. Mientras tanto se prepara la mezcla de solventes para el sistema unidimensional con las proporciones siguientes:

n-butanol, acetona, ácido acético, agua (70:70:20:40)
se agitan bien y se agrega al segundo tanque.

e. Se introduce el cromatograma (ayudándose con los hilos) en el tanque comenzando así el desarrollo del sistema unidimensional. Una vez que el solvente llegó al tope de la placa, ésta se saca y se dejan evaporar los solventes.

f. Se vuelve a introducir el cromatograma en el tanque hasta que de nuevo los solventes alcancen el tope para posteriormente dejarse evaporar.

El desarrollo unidimensional dura aproximadamente 2 horas.

Preparación de la solución de tinción.

a. Se pesan 5 mg de ninhidrina y 1 mg de isatina.

b. Se mezclan con 200 ml de acetona. Se agita hasta disolver la ninhidrina y la isatina, finalmente se agregan

2 ml de lutidina.

Tinción.

a. Se vierte la solución de tinción en la charola de - porcelana, se sumerge el cromatograma totalmente, se saca y se cuelga de los hilos para dejar evaporar un poco la solución de tinción.

El cromatograma se somete a una temperatura de 120 °F- por un tiempo de 5 minutos en una estufa.

SUGERENCIAS.

1. Se recomienda seguir las sugerencias 2 y 4 de la - técnica núm. 1, así como la sugerencia 2 de la técnica núm. 2.

2. Las muestras se colocan a una distancia de 2.5 cm - entre sí para que no ocurran sobreposiciones en los aminoácidos.

3. Al recortar o manejar el papel filtro debe hacerse - uso de guantes de plástico para evitar contaminaciones.

4. El uso de hilo blanco nos va a ayudar a manejar el - cromatograma tanto afuera como adentro de los tanques.

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y ANALISIS DE

RESULTADOS

TECNICA NUM. 1

- El uso de la cinta adhesiva no afectó los resultados obtenidos, ya que no aportó sustancias contaminantes.

- La cinta adhesiva al estar en contacto directo con la placa cromatográfica puede llevarse con ella partes del recubrimiento de celulosa.

- El montaje y desmontaje del sistema es poco práctico, ya que se requiere de mucho cuidado para evitar que la placa se doble o maltrate el recubrimiento de celulosa.

Para montar y desmontar el sistema se necesita la ayuda de segundas personas, por lo que el riesgo de contaminar la placa es mayor.

- Para obtener mejores resultados en la separación de los aminoácidos, se pensó en la posibilidad de llevar a cabo la técnica en placas de 20 x 20 cm, ésta posibilidad -- fué descartada puesto que el tiempo que se requirió para el desarrollo del sistema unidimensional fué del doble, o sea, aproximadamente 4 horas.

- Una vez terminada la técnica, las placas al exponerse a la luz experimentaron un progresivo oscurecimiento.

- Se obtuvieron separaciones poco satisfactorias de los aminoácidos dificultando su identificación.

La concentración de las manchas de los aminoácidos en el cromatograma no fueron tan intensas en relación a la concentración existente de cada aminoácido de las muestras.

- No se observó un desarrollo de color proporcional a la concentración de los aminoácidos.

TECNICA NUM. 2

- El montaje del sistema para llevar a cabo la técnica en sí, no presentó ningún problema, ya que la aplicación de las muestras y el desarrollo del sistema unidimensional fué muy simple.

- Al realizarse la técnica utilizando directamente --- muestras de sangre, los aminoácidos ascendieron acompañados de gigantescas manchas de hemoglobina impidiendo la total - identificación de los aminoácidos.

- La disminución de las cantidades de ninhidrina e is tina en la solución de tinción dió buenos resultados, esto se pudo comprobar en muestras que contenían exclusivamente- estándares de aminoácidos.

TECNICA NUM. 3

- El cambio de etanol por acetona en la preparación de la solución de tinción resultó muy benéfico, ya que la ninhidrina y la isatina se disolvieron por completo.

- El cambio de la colidina por lutidina produjo reacciones coloridas más estables con los aminoácidos.

El tratamiento de las muestras de sangre con autoclave fué una opción que se probó para evitar la interferencia de la hemoglobina en la interpretación de los resultados obteniéndose como resultado una mejoría parcial en virtud de -- que los aminoácidos localizados en la parte inferior del -- cromatograma no sufrieron interferencia alguna, no así los superiores los cuales quedaron enmascarados por la hemoglobina.

- La separación entre los aminoácidos es escasa y se observa superposición de manchas.

TECNICA NUM. 4

- Se cambió el isopropanol por etanol al 70% para la elución de los aminoácidos al papel filtro, logrando evitar por completo la interferencia de la hemoglobina durante el desarrollo unidimensional y la interpretación de los resultados.

- Se utilizó papel filtro watman 1, resultando por demás lento el desarrollo unidimensional.

- Se cambió a papel filtro watman 3 obteniéndose resultados muy buenos en poco tiempo (aproximadamente dos horas el sistema unidimensional) a pesar de que se utilizaron placas de 20 x 20 cm.

- La evaporación de los solventes utilizando el papel-filtro fué más rápida que en las placas de aluminio.

La aplicación de las muestras y el desarrollo de la técnica no presentó mayores problemas, es fácil y ágil su montaje.

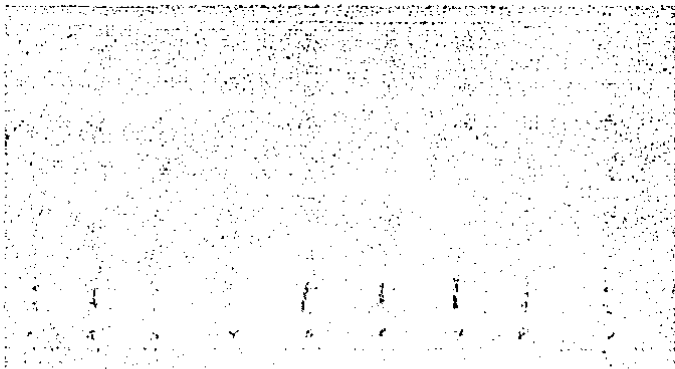
- El papel filtro necesitó de un tiempo muy grande para oscurecerse al contacto con la luz, siendo ésto muy benéfico para la interpretación de los resultados.

- La separación de los aminoácidos entre sí fué excelente, realizándose la identificación de los aminoácidos sin ningún problema.

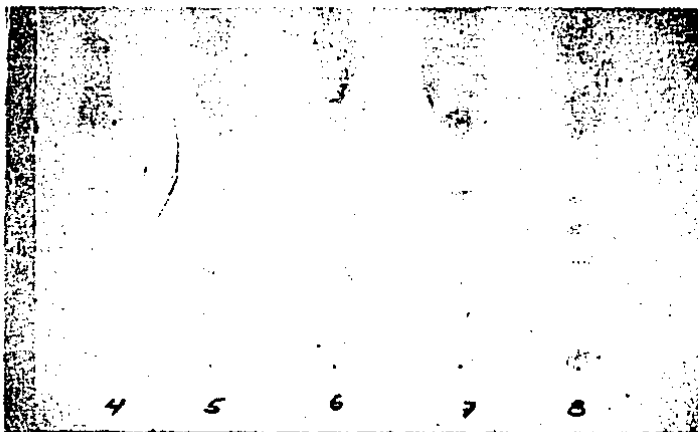
- La intensidad de las coloraciones en las manchas de los aminoácidos resultó acorde a las concentraciones utilizadas.

- Fué rápida la identificación de las diferentes concentraciones utilizadas de un mismo aminoácido en los cromatogramas.

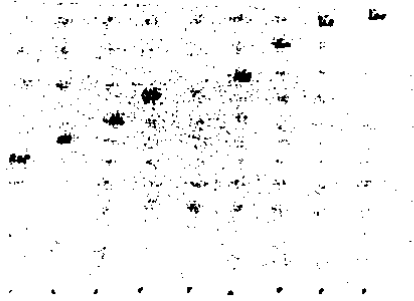
- Las manchas de los aminoácidos fueron más extendidas y de mayor tamaño, menos compactas que las obtenidas en capa fina.



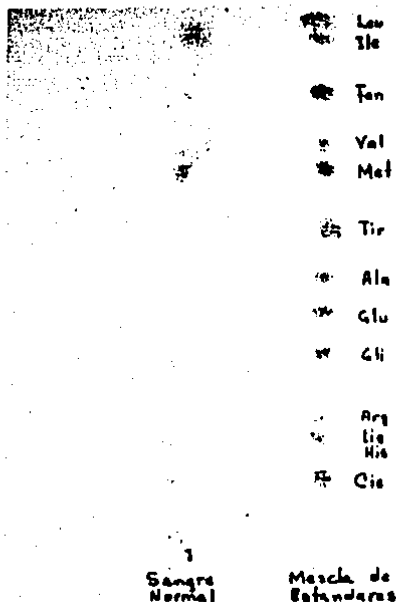
Fotografía núm. 1 Corresponde a la técnica utilizada en el Programa español (técnica -- núm. 1) la cual fue la base y punto de partida para experimentar diferentes variables y lograr una técnica más sensible y confiable. Se puede observar como en los aminoácidos inferiores no existe una separación que ayude a diferenciar un aminoácido de otro. Técnica realizada en capa fina utilizando sangre total.



Fotografía n.ºm. 2. Corresponde a un cromatograma realizado en capa fina utilizando - sangre total y la técnica n.ºm. 3. El tratamiento de las muestras de sangre en autoclave, evitó que los aminoácidos inferiores fueran enmascarados por la hemoglobina, lo cual no sucedió con los aminoácidos superiores.



Fotografía núm. 3 Corresponde a un cromatograma realizado en papel utilizando sangre total y la técnica núm. 4. Se observa como el cambio a etanol para la elución de los aminoácidos al papel filtro resultó bastante benéfico, ya que se evitó que la hemoglobina interfiriera con los aminoácidos. El cromatograma refleja una separación --- ideal de los aminoácidos. Los que se encuentran marcados con sus abreviaturas fueron elevados a una concentración de 20 mg%, si se comparan éstos con la muestra estándar número 5 que contiene sangre normal, se observa como es obvio el incremento de la concentración, en virtud de que las manchas de los aminoácidos poseen una intensidad -- más marcada.



Fotografía núm. 4. Corresponde a un cromatograma realizado en papel utilizando la técnica núm. 4. Para la realización de este cromatograma se preparó una mezcla estándar de aminoácidos con una concentración de 20 - mg% que se comparó con una muestra de sangre total normal. Por medio de este cromatograma se da a conocer la posición de cada aminoácido. En un inicio se llevó a cabo el desarrollo unidimensional utilizando una muestra de sangre y cada uno de los estándares de los aminoácidos, esto dió la correcta posición de éstos en el cromatograma.

Debido a que existen aminoacidopatías cuyo desarrollo se presenta en forma rápida y progresiva causando efectos irreversibles tanto físicos como mentales pero que pueden ser tratadas mediante terapias dietéticas, ha sido necesario desarrollar una técnica de detección rápida que permita identificar prematuramente los metabolitos alterados.

La técnica establecida con este fin, no es cuantitativa, ni lo suficientemente sensible para determinar con precisión el grado de las deficiencias, sin embargo, para este tipo de padecimientos es más importante obtener resultados cualitativos inmediatos que ayuden a detectar a aquellos individuos que presenten alguna aminoacidopatía para dirigirlos al tratamiento adecuado.

Las diversas modificaciones realizadas a la técnica -- cromatográfica en capa fina permiten obtener resultados en un período de 3 horas, teniendo entre otras ventajas un desarrollo de la técnica más simple y práctico, además de obtener resultados más precisos y confiables, ya que al final se utilizaron hojas de papel filtro de 20 x 20 cm que permitieron una mejor separación de los aminoácidos, siendo éstos más fáciles de distinguir.

El uso de esta técnica dentro del Programa de Tamiz Genético requiere de una gran organización por parte de enfermeras y/o médicos que tomarán las muestras, el personal que llevará a cabo dicha metodología (deberá de tomar práctica en el montaje e interpretación de los resultados) y el per-

sonal que hará llegar los resultados a los diferentes hospitales, ya que todo esto se deberá de realizar de una manera coordinada diariamente.

CAPITULO V.

C O R C L U S I O N E S

1. Las aminoacidopatías son errores congénitos del metabolismo que pueden ser detectables durante los primeros días de vida. Son hereditables y producen deterioros mentales, físicos y metabólicos adicionales.

2. Los trastornos del metabolismo de los aminoácidos son descubiertos más frecuentemente en la lactancia y a menudo resultan mortales a edades muy tempranas.

3. Los trastornos del metabolismo de los aminoácidos resultan de mutaciones que alteran la clave genética causando la producción de proteínas con estructuras primaria modificadas.

4. Un defecto en la actividad de una enzima trae como consecuencia un bloqueo en el flujo de metabolitos por la vía metabólica.

5. Las anomalías en el metabolismo de los aminoácidos son generalmente identificados examinando los fluidos corporales.

6. Los efectos de dichos padecimientos pueden prevenirse mediante terapias dietéticas; muchos países han mostrado su preocupación e interés por mantener una población sana y han desarrollado diversas técnicas de detección e implantado programas de tamiz para combatir así el retraso mental ocasionado por errores del metabolismo.

7. Las pruebas de tamiz separan personas aparentemente sanas que probablemente tienen una enfermedad, de aquellas - que no la tienen.

8. Las técnicas de detección de un tamiz deben ser simples, rápidas y económicas; permitiendo en caso de resultados positivos actuar oportunamente.

9. La técnica núm. 1, resultó ser poco práctica y sensible; su montaje y desmontaje, complicado y aparatoso.

10. Las técnicas núm. 2 y 3, no cumplieron con las necesidades de sensibilidad requeridas, dando resultados enmascarados y poco precisos.

11. La técnica núm. 4, es una buena opción a utilizar - en el Programa de Tamiz, ya que es rápida, sensible y económica puesto que en un tanque de cromatografía se pueden desarrollar hasta 45 muestras en un mismo tiempo, con la seguridad de obtener resultados confiables.

12. La técnica desarrollada no es cuantitativa.

13. Las aminoacidopatías son consideradas como enfermedades raras y poco frecuentes, sin embargo esto parece no ser así, ya que tan solo a la fenilcetonuria se le atribuye - (porque no existe una estadística precisa) una incidencia

en nuestro país de 1:15 000, lo cual si tomamos como base - una población total de 80'000,000 de habitantes, resultarían 5333 casos sin tomar en cuenta a los niños que diariamente - nacen. Sería interesante preguntarse, cuántos de estos --- 5333 casos han sido detectados? cuántos individuos contaron- o cuentan con un tratamiento adecuado y oportuno? y sobre to do, cuántos retrasados mentales o muertos resultaron por es- tas enfermedades "raras" y "poco frecuentes"?

BIBLIOGRAFIA

1. Adrianasens, K., Vanheule, R., and Van Belle, M.; -
A new simple screening method for detecting ----
pathological aminoacidemias with collection of ----
blood on paper. Clin. Chem. Acta 15:362 (1967).
2. Armstrong, M. D., Yates, K. N., and Connely, J.; --
Amino acid excretion of newborn infants during the--
first twenty four hours of life. Pediatrics 33:973
(1964).
3. Buist, N. R. M., Jhaveri, B. M.; A guide to screening
newborn infants for inborn errors of metabolism. -
Reprintes from The Journal of Pediatrics, St. Louis
82:3, 511-522.
4. Carnevale, A., Velázquez, A., Ruiz, F., Del Casti--
llo, V.; El manejo en México de pacientes con fe--
nilcetonuria. Boletín Médico del Hospital Infan--
til de México, 36:3, 375-384 (1979).
5. Culley, W. J.; A rapid and simple thin-layer -----
chromatographic method for amino acids in blood. --
Clin. Chem. 15:902 (1969).
6. Efron, M. L., Young, D., Moser, H. W., Mac Cready,--
R. A.; A simple chromatographic screening test for
detection of disorders of amino acid metabolism: --

- technic using whole blood or urine collected on ---
filter paper. N. Engl. J. Med. 270:1378 (1964).
7. Ersser, R. S. and Seakins, J. W.; Screening for --
amino acidopathies with prepared cellulose layers -
on aluminum foil. Nature 223:1388 (1969).
 8. Giguere, R. Shapcott, D., Lemieux, B.; Thin-layer-
chromatographic of amino acids in blood. Journal of
chromatography 95:122-126 (1974).
 9. Guthrie, R., Susi, A.; A simple phenylalanine ---
method for detecting phenylketonuria in large ---
populations of newborn infants. Pediatrics 32:3,
339-343 (1963).
 10. Guthrie, R., Murphey, W. H.; Microbiologic screening
procedures for detection of inborn errors of ----
metabolism in the newborn infant. Reprint from --
Proceedings of Heidelberg, Germany, on June 11-13 --
(1969).
 11. Hansen, H.; Prevention of mental retardation due -
to phenylketonuria: selected aspects of program --
validity. Preventive Medicine 4:310-321 (1975).
 12. Holtzman, N. A., Meek, A. G., Mellits, E. D., ---

- Kallman, C.; Neonatal screening for phenylketonuria: -
II. Age dependence of initial phenylalanine in --
infants with phenylketonuria. Pediatrics 53:353--
357 (1974).
13. Holtzman, N. A., Maek, A. G. Mellits, E. D., Kallman,
C.; Neonatal screening for phenylketonuria: III. -
Altered sex ratio, extent and possible causes. ---
J. Pediatrics 84 (1974).
14. Holtzman, N. A.; Dietary treatments of inborn ---
error of metabolism in the newborn infant. Annu. --
Rev. Med. 21:335-356 (1970).
15. Ibbott, F. A.; Laboratory aids in inborn error of --
metabolism: amino acids. A series of laboratory -
aids from Bio-Science laboratories. 1970.
16. Improved paper-chromatographic method for imino ---
acids. Incorporation of isatin, a color reagent, -
into developing solvents. Reprinted from Clin. --
Chem. Acta 34:481-482 (1969).
17. Ireland, J. T., Read, R. A.; A thin-layer ----
chromatographic method for use in neonatal screening
to detect excess amino acidemia. Ann. Clin. Biochem.
9:129-132 (1972).

18. Jakson, S. H.; Problems in screening infants for-
detect of amino acid metabolism. Clin. Biochem. --
6:15-21 (1973).
19. Kelly, D.; Biochemical methods in medical genetics.
Ed. American Lecture Series, USA. 14-25 (1977).
20. Kitagawa, T., Dwada, M., Sakiyama, T., Kojima, T.,
Kondo, W.; Experience and problems of newborn mass-
screening for inborn errors of metabolism in Japan.
Acta Paediatrica Japonica Overseas Edition 23:1, --
serial no. 45, 1981.
21. Koch, R., Dobson, J., Blaskovice, M., Williamson, -
M., Ernest, A., Friedman, E., and Parker, C.; ----
Collaborative study of children treated for ----
phenylketonuria: a preliminary report. In ----
treatment: the present position and future ----
possibilities. Proceedings of the tenth annual ---
symposium of the society for the study of inborn --
errors of metabolism, edited by Hort, S. and Sander.
Churchill Livingstone, Ltd., London, in Press.
22. Levy, H. L., Madigan, P. M. Lum, A.; Fecal -----
contamination in urine amino acids screening. The-
Amer. J. Clin. Pathol. 51:5 (1969).
23. Levy, H. L., Madigan, P. M.; Massachusetts metabolic
disorders screening. Ped. 49:6 (1972).

24. Levy, H. L.; Neonatal screening for inborn errors of amino acid metabolism. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*. 3:1- (1974).
25. Martuscelli, J., Soberón, G., Palacios, R., (eds.); *Caminos de la biología fundamental*. Dirección general de publicaciones de la UNAM. Méx. 1984. *Experiencias en la prevención y tratamiento de los errores innatos del metabolismo*.
26. Mc Kusich, V. A.; *Mendelian inheritance in man*. 5th. ed. The Johns Hopkins University Press. 1978.
27. *Medico-Social management of inherited metabolic disease*. University Park Press, Baltimore. 1976.
28. *National Academy of Sciences, Genetic screening: principles, programs and research*. Washington, D.C. 188 (1975).
29. Pérez, J. M.; *Ética en la experimentación en humanos*. *Gaceta Méd. (Méx.)* 118:3, 83-92 (1982).
30. Plöchl, E.; *Dünnschichtersmatographische auf trennung von blutaminosäuren aus mit blut beschickten filter papier-plättchen*. *Clin. Chem. Acta* 21:271 (1968).
31. Rowley, P. T.; *Genetic screening: marvel or menace?*. *Science* 25:138-144 (1984).

32. Scriver, C. R., Clow, C. L., Lamm, B.; Plasma amino acids: -- screening quantitation and interpretation. *Am. J. Clin. Nutr.* 24:876 (1971).
33. Scriver, C. R., Clow, C. L., Lamm, B.; On the screening --- diagnosis and investigation of hereditary amino acidopathies. -- *Clinical Biochem. Ontario, Canada.* 1973.
34. Scriver, C. R.; Neonatal screening for inborn errors of ---- metabolism. Dickel, H., Guthrie, R., (eds.) Springer Verlag, Berlin, 1980.
35. Scriver, C. R.; Screening and treatment of hereditary ----- (metabolic) disease. *Human Genetics Symposium, Proc. IV* ---- International, Cong. Human Genetics, p. 10.
36. Schmidt, B. J.; Detección de errores congénitos del metabolis- mo en San Pablo, Brasil. *Bol. Med. Hosp. Infan. Méx.* 38:217- (1981).
37. Shih, V. E., Madigan, P. M.; Improves paper chromatographic -- method for imino acids, incorporation of isatin, a color --- reagent. *Clin. Chem. Acta.* 24:481-482 (1969).
38. Shih, V. E.; Laboratory techniques for the detection of ----- heredity metabolic disorders. Ed. C. R. C. Press, Cleveland.

39. Shull, W. J.; Some considerations in the design of genetic -- surveys. Reprinted from: The Biology of Human Adaptability, - P. T. Baker and Winer (eds.) Oxford, Clarendon Press 25-53 - (1966).
40. Smith, I.; Paper chromatographic apparatus and techniques, in- chromatographic and electrophoretic techniques, vol. I, ---- Chromatographic, 3er. ed., Smith, I., Ed. John Wiley and Sons, 166 (1968).
41. Smith, I., Rider, J., Lerner, R. P.; Chromatography of amino - acids, indoles and imidazoles on thin-layers of avicel and --- cellulose and on paper. J. Chromatog. 26:449 (1967).
42. Stahl, E.; Instruments used in thin-layer chromatography and - their operation, in thin-layer chromatography handbook. Stahl, E., Ed. Academic Press, 5 (1965),
43. Stanbury, J. B., Wyngarden, J. B.; The metabolic basis of ---- inherits disease. Mc Graw Hill Co. 1-33 (1978).
44. Thomas, G. H., Howell, R. R.; Selected screening tests for -- genetic metabolic diseases. Year book medical publishers inc. 1973.

46. Ugarte, M.; Programas de detección precoz de metabopatías - en España. Informe. Real Patronato de Educación y Atención a deficientes. Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad. Consejo Nacional. Madrid 1982.
47. Valdivieso, F., Giménez, C., Benavides, J., Aragón, M.; Patogénesis de la disfunción cerebral en la fenilcetonuria. Revista española de fisiología. 38:189-194 (1982).
48. Velázquez, A., Montiel, F., Shaw, K., Carnevale, A., Del Castillo, V.; Enfermedad de orina de jarabe de arce: heterogeneidad genética, diagnóstico de heterocigotos y un nuevo enfoque terapéutico. Rev. de inv. clín. 33:273-279 (1981).
49. Velázquez, A., Villarreal, M. L., Galindo, L. M.; Newborn -- genetic screening: the mexican program. Human Genetics p. 214- (1975).
50. Wilson, J. M. G., Jungner, G.; Principles and practice of - screening for disease. (Geneva: WHO, Public Health Paper no.- 34).