

5  
2  
e  
je



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



**“ Técnica Espectrofotométrica de la Cinética Enzimática de la Fenilalanina Hidroxilasa (in vitro), como una Alternativa para el Diagnóstico Clínico de Fenilcetonuria ”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A N**

**MA. ROSARIO RUIZ VENEGAS**

**ANGEL HOMERO ZAMORA LUCERO**

**DIRECTOR DE TESIS: Q. F. B. RAMON CENDEJAS RAMIREZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
SECRETARIA ACADEMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS.  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

" Técnica Espectrofotométrica de la Cinética Enzimática de la Fenilalanina  
Hidroxilasa (in vitro), como una Alternativa para el Diagnóstico Clínico  
de Fenilcetonuria"

que presenta la pasante: Ma. Rosario Ruiz Venegas  
con número de cuenta: 8454152-1 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga. ; en colaboración con :  
Angel Homero Zamora Lucero

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Enero de 1994

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ramón Cedejas Ramírez.</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Idalia Ayala Miyazawa</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Martha P. Zúñiga Cruz.</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. René Damían Santos.</u>	



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
SECRETARIA ACADEMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS.  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Técnica Espectrofotométrica de la Cinética Enzimática de la Fenilalanina Hidroxilasa (in vitro), como una Alternativa para el Diagnóstico Clínico-de Fenilcetonuria".

que presenta el pasante: Angel Homero Zamora Lucero

con número de cuenta: 8759500-4 para obtener el TITULO de:

Químico Farmacéutico Biólogo ; en colaboración con :

Ma. Rosario Ruiz Venegas.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcahli, Edo. de Méx., a 24 de Enero de 1994.

PRESIDENTE Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez

VOCAL Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa

SECRETARIO Q.F.B. Martha P. Zúñiga Cruz

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. René Damían Santos.

## AGRADECIMIENTOS

A todos nuestros profesores, que de alguna manera colaborarán para llegar al final de este proyecto.

A nuestro asesor en este trabajo, Q.F.B. Ramón Cedejas Ramírez por ayudarnos a darle término a este trabajo, con sus valiosas sugerencias.

A las siguientes personas, que con su colaboración nos brindarán su apoyo para complementar este trabajo:

Lic. Ignacio García Salgado.  
Sr. Florentino Terrazas Luna.  
Sra. Alicia Herrera Godínez.  
Sr. Raymundo Pérez Heredia.

A todos nuestros amigos y compañeros de la carrera, que compartieron los momentos dulces y amargos en la etapa como estudiantes de la misma.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

''TECNICA ESPECTROFOTOMETRICA DE LA CINETICA ENZIMATICA DE LA  
FENILALANINA HIDROXILASA (IN VITRO) COMO UNA ALTERNATIVA PARA EL  
DIAGNOSTICO CLINICO DE FENILCETONURIA.''

SUSTENTANTES: pQ.F.B. Ruiz Venegas Ma. Rosario.  
pQ.F.B. Zamora Lucero Angel Homero.

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. Ramón Cedejas Ramirez.

## AGRADECIMIENTOS

ROSARIO :

A mis padres, por darme la oportunidad de elegir mi camino y por el apoyo incondicional que me brindarán en toda mi vida de estudiante,..., Dios los cuide, los quiero.

A todos mis hermanos por la comprensión brindada en todo el tiempo de mi formación profesional y por compartir este orgullo...los quiero.

A mis compañeros de trabajo, por permitirme el tiempo y la asesoría para concluir este trabajo mil gracias, (Dr. Eliseo Hernández B., Mc Sofía González G., Rodolfo Robles., Jacobo Garibay.E.)

A los delegados administrativos de campo 1, por su ayuda para ingresar a laborar en esta facultad, muchas gracias ( Ma.Elena., Manuel, Guillermo O., Guillermo G.)

GRACIAS DIOS

Para ti , Angel H. que llegaste a brindarme el apoyo, comprensión, y el amor, a mi vida como mujer, y como profesionista y así seguir caminando juntos hasta llegar a la meta, Demostrando que esto es un pequeño ejemplo de lo que podemos llegar hacer juntos ...Cuidate.

TE AMO



ANGEL :

A ti mama, porque con tu apoyo y comprensión en esos momentos difíciles, que me diste las fuerzas necesarias para seguir adelante, madre, gracias por creer en mí, por haberme dado la oportunidad de vivir, ...te quiero.

A ti papa, porque con ese carácter que nos heredaste a cada uno de tus hijos, me ha permitido en lo particular afrontar cualquier adversidad que se me presente, padre me has demostrado, que hay que ser tenaz en nuestras convicciones y principios, ...te respeto.

A ambos me siento muy orgulloso de ser su hijo, sus esfuerzos y sus sacrificios no han sido en vano, papas, ...se los agradezco y no se como pagarles todo lo que nos han dado.

A mi abuelito Roberto, que desde mi infancia también me enseñó a ser responsable de cada acción en la vida.

A mi Abuelita Abigail, por compartir un trocito de su vida con sus nietos, que en paz descanse.

A mis hermanos : Marco Tulio, Xochitl, Lariza, Mao Tse Tung, Yuri, Vladimir, Ludmila, e Isamara, por ser como son y estar unidos en cualquier momento.

Y en especial a ti Rosario, mi prometida, por permitirme ser parte de tu vida, por que el vacío que existía en mí lo has llenado con una vitalidad inagotable de felicidad y cariño, te admiro, te respeto como la mujer que eres, gracias, muchas gracias por estar conmigo, por tu confianza y cariño, en pocas palabras, ...te amo.

## INTRODUCCION

Historicamente, ciertos transtornos del metabolismo de los aminoácidos en el hombre, han desempeñado papeles clave en el esclarecimiento de las vías por las que estos compuestos son metabolizados en sujetos normales.(17)

Por ejemplo el trastorno metabólico conocido como fenilcetonuria si no es detectado en los primeros meses de vida, conduce a un retraso mental grave e irreversible, que se debe a la ausencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, que realiza el paso metabólico de fenilalanina a tirosina.(76)

Cuando se descubrió la naturaleza de la fenilcetonuria, se hizo patente tratarla sometiendo al recién nacido, a una dieta restringida en el contenido de fenilalanina, garantizando los nutrientes necesarios para el desarrollo normal del afectado. De aquí la importancia de contar con una prueba de diagnóstico para fenilcetonuria, ya que esta debe ser rápida, fácil de realizar, sensible y económica, que pueda ser implementada en el laboratorio de diagnóstico clínico.(19)

Una prueba de selección útil, pero poco confiable, depende de la identificación concentraciones urinarias de fenilpiruvato como la prueba de cloruro férrico (Reactivo que es muy inestable), teniendo poca confiabilidad en los resultados obtenidos con esta prueba.

En el presente trabajo se establecen las condiciones experimentales de la cinética enzimática de la fenilalanina hidroxilasa como un antecedente, para que a futuro se implemente una prueba de diagnóstico con las características antes mencionadas.

**OBJETIVOS :**

1) Seleccionar y analizar las variables, que interaccionan con el diseño experimental para la cinética enzimática de la fenilalanina hidroxilasa.

2) Establecer las condiciones experimentales (in vitro), para la cinética de la fenilalanina hidroxilasa, en extracto parcial purificado de hígado de carnero, con la infraestructura del laboratorio de diagnóstico clínico y patología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo #1).

3) Proponer la cinética de la fenilalanina hidroxilasa, como un antecedente para la implementación de una técnica de diagnóstico para la fenilcetonuria.

4) Mediante un análisis hipotético plantear que relación existe entre la concentración de NADH y la concentración de fenilalanina, al utilizar la Espectrofotometría de absorción.

## INDICE

TITULO

INTRODUCCION

OBJETIVOS

CAPITULO I: FENILCETONURIA.....	1
1.- DEFINICION.....	1
1.1. Definición de errores innatos del metabolismo.....	1
1.2 Definición de Fenilcetonuria.....	1
2.- GENERALIDADES.....	3
2.1. Genética de la enfermedad.....	3
2.2. Metabolismo y bioquímica de la enfermedad.....	4
2.3. Fenilcetonuria Clásica (Clasificación de hiperfenilalaninemias).....	10
2.4. Patología.....	11
2.5 Cuadro clínico.....	13
2.6. Tratamiento.....	15
2.7. Diagnóstico de laboratorio.....	17
3.- ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASA.....	23
3.1. Componentes del sistema enzimático.....	23
3.2. Clasificación de acuerdo a la Unión Internacional de Bioquímica (IUB).....	24
3.3. Propiedades químicas, biológicas y físicas de fenilalanina hidroxilasa.....	24
3.4. Mecanismo de acción.....	25
3.5. Procesos de regulación de la enzima fenilalanina hidroxilasa.....	25

<b>CAPITULO II : METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
<b>CAPITULO III : RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPITULO IV : ANALISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>71</b>

## CAPITULO I : FENILCETONURIA.

### 1.1. Definición de Errores Innatos del Metabolismo.

El concepto de Errores Innatos del Metabolismo, como causa de enfermedad fue sugerido por primera vez en el año de 1902 por el médico *Sir. Archibald Garrod*, poco después del redescubrimiento de las leyes mendelianas. (17)

Por lo cual un Error Innato del Metabolismo se define como: "Un trastorno bioquímico determinado por factores genéticos, en base al principio actual de un "Cistrón - un polipeptido" , (*Un gen-Una enzima*), que sigue un mecanismo de herencia de acuerdo a las leyes mendelianas, (Autosómica Dominante, Autosómica recesiva y ligada al sexo)". (17,22,23,82) (Fig. # 1)

### 1.2.- Definición.

La *Fenilcetonuria* o también denominada *Oligofrenia Piruvica*, es un error innato de el metabolismo, que se caracteriza por la ausencia de la enzima *fenilalanina hidroxilasa* (17), la cual se encuentra localizada en el hígado, en donde bioquímicamente convierte a la *Fenilalanina* en el aminoácido *tirosina*, como un primer paso metabólico en la biosíntesis de catecolaminas y que de acuerdo a las leyes mendelianas sigue un mecanismo autosómico recesivo (76), es decir que ambos progenitores deben ser portadores heterocigotos del gen, para que su descendencia produzca el genotipo recesivo de la *fenilcetonuria*. (Fig. # 1)

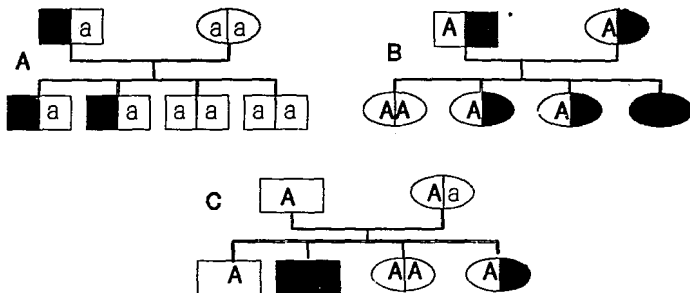
Reconocido en 1909, el principio de "*Un gen-Una enzima*", postulado por *Garrod* (18), se necesitó que pasaran 25 años para que por primera vez se demostrara este principio experimentalmente, en base a estudios realizados por *Folling* en 1934 (23,26), en 10 pacientes con severo cuadro de retraso mental y eliminación de altas concentraciones de ácido *fenilpirúvico* en la orina, por lo tanto se considera a la *fenilcetonuria*, como el primer error innato del metabolismo, donde un defecto enzimático es capaz de producir una alteración metabólica. (72)

**Fig.#1.-** Patron de Herencia de las Enfermedades Mendelianas.

A) *Enfermedad Autosomica Dominante.*

B) *Enfermedad Autosomica Recesiva.*

C) *Enfermedad Ligada al Cromosoma X.*



\* Los heterocigotos estan afectados. (20)



Mujer



Varón



Afectado



Heterocigoto

Jervis por otro lado propone en 1953 (17), que este defecto esta relacionado a un gen autosomico recesivo, el cual tiene la informacion para el desarrollo de la fenilcetonuria, Jervis encontro que la alteracion se debia a la incapacidad de oxidar a la *fenilalanina* a *tirosina*, por la *fenilalanina hidroxilasa* inactiva en higado en ese tipo de pacientes.(76)

Debido al impacto que tuvo ese descubrimiento, a esta enfermedad se le denominó con diferentes nombres: "*Imbecillitus phenylpyruvica de Folling's*" y "*Oligofrenia piruvica*", por lo que el termino de fenilcetonuria, fue introducido por primera vez por *Penrose* y *Quastel* en 1937, sugerido por la eliminacion de fenilcetona en la orina.(6)

## 2.-GENERALIDADES.

### 2.1.Genética de la Enfermedad.

Este defecto metabólico se puede explicar desde un punto de vista genético, es decir que la ausencia de la enzima es debido a una mutación a nivel de la secuencia de aminoácidos del gen, que codifica para la síntesis de la *fenilalanina hidroxilasa*, la secuencia de nucleótidos del gen mutante es similar a la del gen normal, con la excepción de que el nucleótido de la base *Adenina-Guanina(A-G)* varia en la transición final de la unión de la cadena 5' a nivel del intrón 12, alterando el dinucleótido normal de *Guanina-Timina(G-T)* al de *Adenina-Timina(A-T)* esta transferencia y expresión de el gen demuestra que la mutación resulta finalmente en un proceso anormal de la síntesis de ARNm y por lo tanto en la actividad de la enzima *fenilalanina hidroxilasa*.(7,9,15,19)

Se ha demostrado sobre la secuencia del ADN mutante de la enzima, que la falla se localiza al momento del salto del exón 12 en la maduración del ARNm, observandose que la mutación de G-T al dinucleótido A-T ocurre en el haplotipo 3 cromosómico, es decir que se bloquea de esta forma la síntesis de la enzima *fenilalanina hidroxilasa*, produciendose por lo tanto la *fenilcetonuria*.(20)



## 2.2. Metabolismo y Bioquímica de la Enfermedad.

### 2.2.1. Anabolismo de Fenilalanina

La *fenilalanina* es un aminoácido aromático, esencial en la síntesis proteica en tejidos de los mamíferos, la *fenilalanina* no tiene ningún otro papel metabólico normal, que ser el precursor directo de la *tirosina*. (18)

La reacción de hidroxilación de *fenilalanina* a *tirosina* se realiza por un rearrreglo intramolecular en el anillo benzenico, en donde el hidrógeno que se encontraba en la posición 4 se mueve hacia la posición 3, en este momento la *fenilalanina hidroxilasa* utiliza NADH y oxígeno molecular, en donde una molécula de oxígeno se reduce a agua, y la otra molécula la utiliza para la formación de un grupo hidroxilo el cual va a ser insertado en el anillo fenilo, este paso ha sido demostrado mediante el rastreo de carbono 14 marcado y subsecuentemente encontrado en la posición 4 de la *tirosina*. (54)

Al mismo tiempo, el cofactor enzimático tetrahidrobiopterina (TBH<sub>4</sub>) actúa como un sistema transportador de electrones, por lo que se oxida a su forma quinóidea de la dihidrobiopterina reacción catalizada por la enzima dihidropteridina reductasa para la formación de *tirosina*. (Fig. # 2) (18)

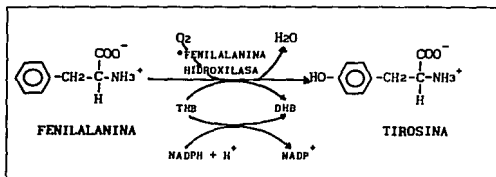


Fig. #2.-Vía metabólica para la hidroxilación de la fenilalanina a Tirosina. (77)

### 2.2.2. Metabolismo de Tirosina .

El aminoácido obtenido a partir de la hidroxilación de la fenilalanina es la tirosina, su metabolismo lo podemos dividir en dos vías diferentes:

- 1) VIA ACETOACETATO-FUMARATO.
- 2) VIA BIOSINTESIS DE CATECOLAMINAS.

#### 1) Vía Acetoacetato-Fumarato.

En esta etapa del metabolismo de la tirosina, la transaminación a p-hidroxifenilpiruvato, se lleva a cabo en el hígado, esta oxidación es muy compleja, se añaden los átomos del oxígeno al carbono alfa de la cadena lateral y al carbono del anillo al que está unido esta cadena, esta enzima contiene hierro ( $Fe^{2+}$ ).

La oxidación del grupo carbonilo a carboxilo es acompañada de la descarboxilación del grupo ácido original, para un mejor acomodamiento del grupo hidroxilo en el anillo, la cadena lateral acortada se desplaza a un átomo de carbono adyacente, obteniéndose el homogentisato. Otra oxigenasa, que contiene hierro rompe el anillo aromático por adición de átomos de oxígeno a los carbonos 1-2 la configuración cis del doble enlace en el anillo abierto es la base para la producción de maleilacetoacetato.

En el cual se realiza una isomerización del doble enlace a la configuración trans del fumarilacetoacetato, para producir fumarato y acetoacetato, intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. (17) (Fig. # 3)

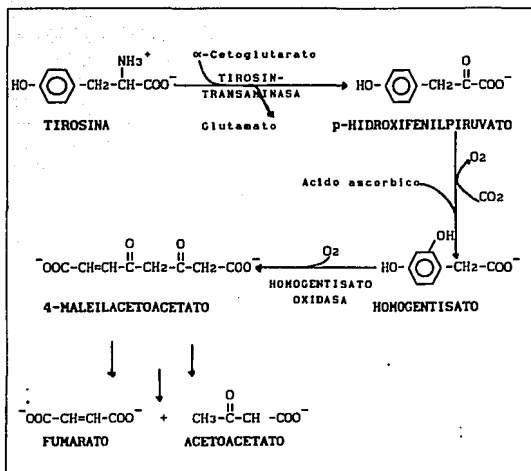


Fig. # 3.-Metabolismo de tirosina, vía aceto-acetato. (77)

## 2) Vía Biosíntesis de Catecolaminas

Esta segunda etapa o paso normal del metabolismo de la tirosina involucra la producción de los neurotransmisores, como las catecolaminas (DOPA, Adrenalina y Noradrenalina), se sintetizan por la hidroxilación de la tirosina por acción de la enzima *tirosina hidroxilasa*, que es semejante en función y -necesidades de coenzima a la *fenilalanina hidroxilasa* y esta se encuentra localizada en sistema nervioso central, en los ganglios simpáticos y en las glándulas suprarrenales.

La hidroxilación de la tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) es el punto de arranque de una secuencia de reacciones, que llevan a varios agentes fisiológicos importantes.

La descarboxilación de la DOPA por medio de la enzima DOPA-descarboxilasa en presencia de piridoxal fosfato origina la DOPAMINA, que se encuentra en regiones específicas del cerebro actuando como neurotransmisor.

La DOPAMINA es hidroxilada en la posición Beta( $\beta$ ) de la cadena lateral, por medio de la enzima Dopamina-hidroxilasa, la cual requiere de ión cobre para ser activada y producir la Noradrenalina localizada en granulos cromafínicos, hasta el momento en que las células son estimuladas para liberarla a la sangre, la mayor parte de la Noradrenalina es metilada por la feniletanolamina-N-metiltransferasa relativamente inespecífica para adrenalina, para que posteriormente sea liberada en la transmisión sináptica del impulso nervioso. (17) (Fig. # 4)

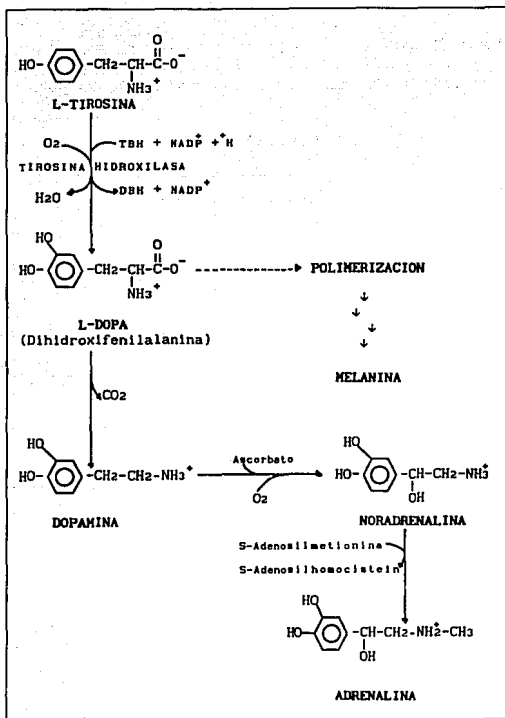


Fig.# 4.- Ruta metabólica de tirosina, vía biosíntesis de catecolaminas. (19)

### 2.2.3. Bioquímica de la Enfermedad.

Como se ha mencionado, en la fenilcetonuria la principal causa es la ausencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa esto implica, que el paso metabólico de fenilalanina a tirosina no es realizado. (Fig. # 5) (17)

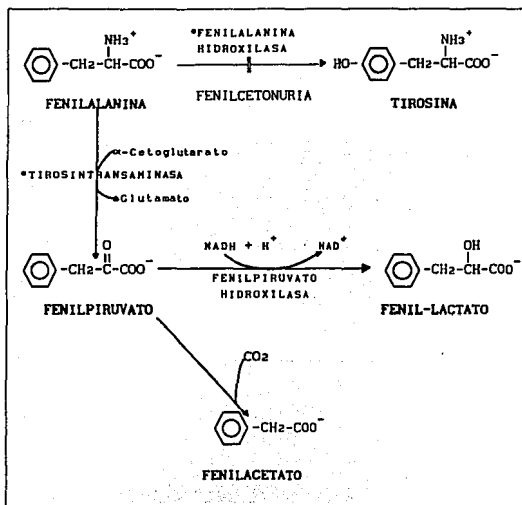


Fig.#5.-Metabolismo de la Fenilcetonuria y la vía alterna de la depuración de la fenilalanina.(17)

2.3. Fenilcetonuria Clásica ( Clasificación de Hipernilalaninemias).

Se le denomina hiperfenilalaninemia, al aumento de la concentración de *fenilalanina* en sangre.

Este trastorno se origina por 3 causas principales :

1) Defecto en la actividad de la *fenilalanina hidroxilasa*.(19)

-Hiperfenilalaninemia tipo I: Ausencia de la enzima *fenilalanina hidroxilasa* (Causa principal de la fenilcetonuria clásica).

-Hiperfenilalaninemia tipo II: Se debe a la deficiencia a nivel de la actividad de la enzima *fenilalanina hidroxilasa*.

-Hiperfenilalaninemia tipo III: Se debe a un problema a nivel de la conformación molecular de la enzima, para que sea completamente activa.

2) Deficiencia a nivel de la producción de Dihidrobiopterina.(19)

-Hiperfenilalaninemia tipo IV: Es a causa de la ausencia de la enzima *Dihidrobiopteridina reductasa*.

-Hiperfenilalaninemia tipo V: Se produce por la deficiencia del cofactor *tetrahidrobiopterina*, debido al deficit de la actividad de la enzima *Biopterina sintetasa*.

3) Por defectos a nivel del metabolismo de *tirosina*.(19)

-Hiperfenilalaninemia tipo VI: *Tirosinemias*, producidas por la disminución de *tirosina* en sangre.(Fig.# 1)

DEFECTO	[Fenilalanina en sangre] (mg/l)
- Hiperfenilalaninemia tipo I (Fenilcetonuria clasica)	
* No Tratada	300
* Tratada	30-80
-Hiperfenilalaninemia tipo II	40-300
-Hiperfenilalaninemia tipo III	No reportados
-Hiperfenilalaninemia tipo IV	160-530
-Hiperfenilalaninemia tipo V	210-490
-Hiperfenilalaninemia tipo VI	40-200

Tabla #1.-Concentración de fenilalanina en Hiperfenilalaninemias de diferente origen.(19)

#### 2.4.Patología.

El fenilpiruvato que se reduce a fenilactato y que tambien se descarboxila a fenilacetato, son los compuestos aromáticos que realmente producen la lesión durante el desarrollo cerebral infantil, el daño cerebral se ha reportado, que se da a 2 - niveles:

I) A nivel de la deformación de la capa mielínica neuronal, por la disminución del número de neuronas por muerte celular, a nivel de los hemisferios cerebrales. (53,58,80,81)

II) A nivel de la eficiencia del proceso sináptico, debido al aumento anormal de las espinas dendríticas de las células piramidales de la región primaria apical(Estrato radial), en el hipocampo cerebral, donde se supone que el aumento de las



*espinas es inducido por las fibras aferentes, producido por los efectos toxicos del fenilacetato y da como consecuencia la disminuci3n de la sinapsis. (69)*

#### 2.4.1. Incidencia

Los primeros datos para poder calcular la incidencia de la fenilcetonuria, consistia en medir la frecuencia de casos reportados en instituciones mentales. Jervis cálculo que la incidencia de fenilcetonuria en la poblaci3n general era de 0.006% (6 casos por cada 100,000 nacimientos), actualmente se ha aceptado que realmente es del 0.004% obtenido para una poblaci3n especifica. (83)

Por eso actualmente para el cálculo de la incidencia, se basa en millones de pruebas realizadas a recién nacidos, así como a diferentes edades, con el fin de estimar con mayor exactitud, el número de pacientes fenilcetonuricos no tratados existentes en la poblaci3n con posible inteligencia normal y con retraso mental. (91)

Desafortunadamente en México, no se ha podido calcular la incidencia de fenilcetonuria, por lo que es necesario implementar un diagnóstico masivo, sencillo, barato y eficaz. (6)

#### 2.4.2. Distribuci3n (Edad) y mortalidad.

En base a estudios realizados en paises con mayor incidencia de fenilcetonuria (PKU), se ha reportado que esta enfermedad se manifiesta en los primeros años de vida por eso, cuando nos referimos a la distribuci3n, se refiere mas que nada a la relaci3n edad-mortalidad de los individuos afectados. (83)

Como sabemos la fenilcetonuria se manifiesta en el transcurso de los primeros 5 años de vida, esto se fundamenta en estudios realizados por Knox, donde menciona un intervalo de edades entre 5 - a 35 años, como edad promedio de vida, que fue el primer investigador que reporto estos datos. (30)

#### 2.4.3. Relación con el sexo

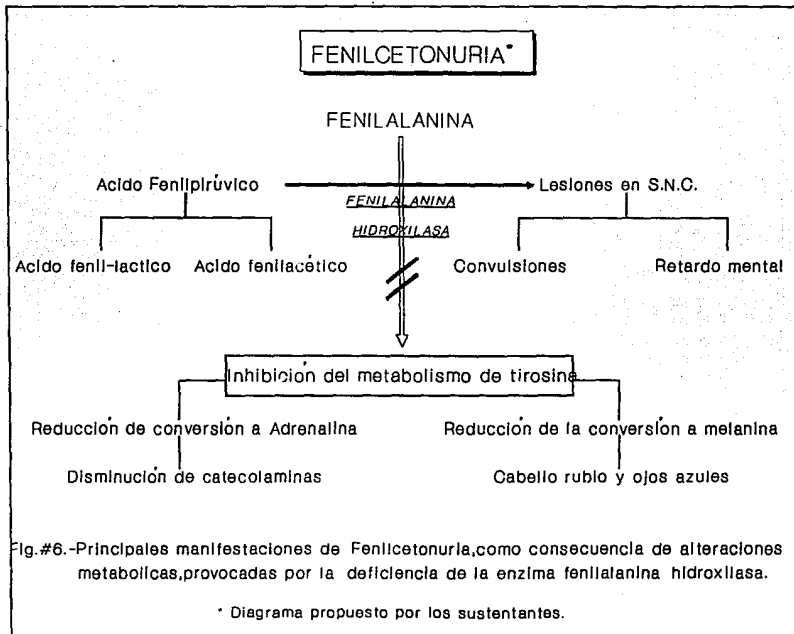
En 1954 el investigador Jervis encontró, que no existe ninguna variación, en cuanto a la incidencia de fenilcetonuria con respecto a ambos sexos, pero aparentemente el cuadro clínico es mas severo en el sexo masculino que en el femenino en donde se reporta , que se presenta mayor concentración de *fenilalanina* en recién nacidos cuantificada con pruebas de diagnóstico neonatales(17,68).

#### 2.5. Cuadro Clínico (Signos y síntomas).

Los pacientes que sufren fenilcetonuria, nacen aparentemente normales, presentan elevación escasa o nula de la concentración serica de *fenilalanina* al nacer, sin embargo por la general al término de 2-3 semanas se aumenta la concentración de *fenilalanina* en suero y estos pacientes comienzan a eliminar ácido fenilpiruvico en la orina y después de 3 meses muestran signos de daño cerebral presentado mediante un electroencefalograma anormal y convulsiones.(69)

En la fenilcetonuria clásica (Tipo I), los pacientes emiten un olor rancio o avinagrado, debido a la producción excesiva de ácido fenilacético. Progresivamente el deficit neurológico se agrava, las convulsiones se tornan mas frecuentes y graves, se retrasa el desarrollo motor, vomitos é irritabilidad, que generalmente después de el primer año de vida se presenta un cuadro de retraso mental, que va de moderado a grave, ademas debido a que estos pacientes sintetizan escasa producción de melanina, frecuentemente tienen tez blanca, pelo rubio y ojos azules, se ha reportado que aproximadamente el 50% de fenilcetonuricos se mantienen asintomáticos en periodos largos, ( A veces años) y al desarrollar el cuadro de retraso mental ya no es posible ningún tratamiento.(Fig.# 6)

Debido a los transtornos anteriormente mencionados el 50% de los fenilcetonuricos que no han sido sometidos a ningún tratamiento mueren aproximadamente a los 25 años. (69)



## 2.6.Tratamiento.

### 2.6.1.Valores Normales.

Los valores normales de fenilalanina en suero de pacientes adultos es de  $15 \pm 3$   $\mu\text{g/ml}$ , en lactantes y niños se ha reportado de  $12\mu\text{g/ml}$  con un rango normal de 8- $16\mu\text{g/ml}$ .(2)

### 2.6.2.Terapia.

La patología que se produce en los fenilcetonuricos, puede tratarse de 2 maneras:

a) La terapia convencional, consiste en la elaboración y - formulación de una dieta baja en el contenido de fenilalanina y así cubrir las cantidades mínimas requeridas de nutrientes, para el desarrollo normal de los recién nacidos a los que se les ha diagnosticado esta enfermedad, se han formulado en otros países (Canada, U.S.A.), alimentos sintéticos comerciales como son "Phenyl-free, Mead-Johnson, Cows-milk, etc..., que tienen como base leche evaporada complementada con minerales, vitaminas, carbohidratos,...etc, dieta rígida, que debe mantenerse durante los primeros 10 años de vida, tiempo suficiente para la maduración del sistema nervioso, así como tejidos relacionados. (Tabla # 2 )(2,17,64)

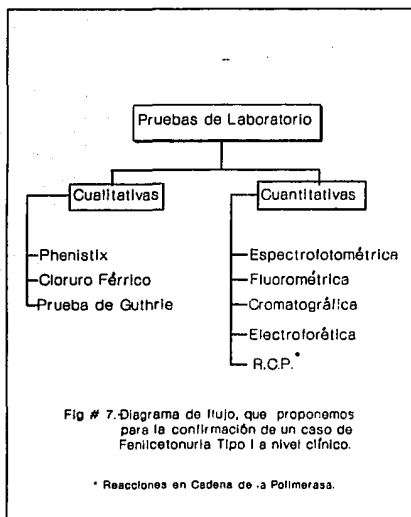
b ) Otra alternativa, que se ha propuesto para la terapia de fenilcetonuria, es la administración intravenosa de precursores de las catecolaminas como la 5-Hidroxitriptofano y 3,4-Hidro-xifenilalanina (DOPA), como una terapia de sustitución de los precursores de las catecolaminas.(80)

Tambien cabe mencionar que se ha reportado, que en caso de Hiperfenilalaninemia tipo V (Deficiencia del cofactor THB) no responde a la terapia nutricional, por lo que se ha sugerido la administración intravenosa de Tetrahydrobiopterina, con el fin de reducir los niveles elevados de fenilalanina en sangre.(17)

Ingredientes	Energía (Kcal)	Proteínas (g)	Fenilalanina (mg)	Líquidos (ml)
-55g de Lofenalac	253	8.3	44	0
-4onzas de leche entera de vaca	80	4.4	200	120
-4cucharaditas de miel Karo	80	0	0	0
-Agua	0	0	0	405
Totales	413	12.7	244	525

Tabla #2. Cantidades de ingredientes necesarios en la dieta para el recién nacido.(64)

## 2.7. Diagnóstico de Laboratorio (Fig. # 7)



2.7.1. Fundamentos de técnicas para la cuantificación de fenilalanina.

- Pruebas Cualitativas

1) Phenistix [Tira reactiva Phenistix, que contiene como reactivos a Sulfato de Amonio Férrico, Sulfato de Magnesio y - Acido Ciclohexilsulfámico];

El principio de esta prueba consiste en la reacción de los iones ferricos con el ácido fenilpirúvico, dando una coloración de gris-verde. Los iones de magnesio ayudan a disminuir la interferencia de los fosfatos urinarios y el ácido ciclohexilsulfámico proporciona el medio ácido para la reacción. (32)

2) Cloruro Férrico [Líquido]: Esta prueba tiene el mismo principio de la tira reactiva Phenistix, pero la diferencia radica en la presentación del reactivo de cloruro férrico (líquido).

En esta técnica es preparado al 10% en agua destilada (No en medio ácido) lo cual propicia, que la reacción se de con una amplia variedad de compuestos, que desarrollan diversos colores, con lo que se debe tener precaución para la determinación de un diagnóstico. (Tabla # 3 y 4) (32)

Sustancia	Color Producido
- Ac. fenilpiruvico	Verde -Azul
- Ac. P-hidroxisfenilpiruvico	Verde
- Ac. homogentisico	Azul o verde
- Ac. Imidazol piruvico	Verde o Azul
- Ac. xanturenico	Verde intenso
- Bilirrubina	Verde-Azul
- Melanina	Precipitado verde
- Ac. vanilico	Rojo-malva
- Ac. acetoacetico	Rojo- casta
- Ac. piruvico	Amarillo oro intenso
- Salicilatos	Purpura estable
- Fenotiazinas	Purpura
- Derivados del fenol	Violeta
- Antipirinas	Rojo
- Cianatos	Rojo

Tabla #3.- Sustancias que reaccionan a la prueba de cloruro ferrico. (32)



Enfermedad	Cloruro Ferrico (FeCl <sub>3</sub> )
Fenilcetonuria	Verde
Tirosinuria	Verde (Desaparece rapidamente)
Galactosemia	Verde
Histidinemia	Oliva
Leucinosis	Gris Verdoso
Hiperglicinemia	Verde
Alcaptonuria	Azul- Verde

Tabla #4.-Algunas enfermedades sensibles a la prueba de cloruro ferrico. (32)

3) Prueba de Guthrie (Inhibición microbiológica del *Bacillus subtilis*): Esta prueba de inhibición microbiana se basa en la propiedad, que tiene la  $\alpha$ -Tienilalanina, para inhibir el crecimiento del *Bacillus subtilis*, cuando hay elevadas cantidades de *fenilalanina* en sangre, la inhibición del microorganismo permite detectar la hiperfenilalaninemia tipo I (Fenilcetonuria clásica).

Esta prueba es semicuantitativa y solo puede aplicarse a un solo aminoácido, que es la *fenilalanina*, que por su sencillez y especificidad es el método masivo neonatal de elección en muchos países a nivel hospitalario para la detección de la *fenilcetonuria* la prueba es exacta dentro del intervalo de 20-400 mg/l de *fenilalanina*. (42)

## P r u e b a s C u a n t i t a t i v a s

1) Espectrofotométrica: Recientemente se han desarrollado métodos específicos y sensibles, que permiten la detección de *fenilalanina* en plasma, esta prueba se basa en la cinética enzimática de la *fenilalanina* amoniaco liasa de levadura, que cataliza la conversión de *L-fenilalanina* a el ácido transcinámico, que se mide a 290nm donde la concentración de ácido transcinámico es proporcional a la concentración de *fenilalanina* en la muestra. (19)

2) Fluorométrica: El método de McCaman y Robins, es preferido como prueba de rutina para la determinación de *fenilalanina*, por su simplicidad, sensibilidad y bajo costo, el procedimiento esta basado en el aumento de fluorescencia producido cuando la *fenilalanina* se condensa con ninhidrina en presencia del peptido *L-leucil-L-alanina* el pH de la reacción es de 5.9 y el compuesto fluorescente se estabiliza con tartrato de cobre. La longitud de onda de absorción es de 365-390 nm y la longitud de onda de emisión es de 489-515 nm, la exactitud de la técnica es de hasta 5mg/l de *fenilalanina* en suero o plasma. (19)

3) Cromatográfica: Las técnicas cromatográficas ofrecen una excelente combinación de la rapidez, especificidad y sensibilidad para la detección de aminoácidos, actualmente existen 2 métodos de cromatografía de alta resolución. (42)

a) Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) de intercambio iónico es el método más confiable para la medición de *fenilalanina* ya que se emplea un analizador automatizado de aminoácidos, donde se emplea una columna catiónica simple de Pietz y Morris, que contiene resinas de poliestireno sulfonado (Dowex-50) que tiene afinidad por la porción catiónica y no

iónica del aminoácido, que son eluidos con amortiguador de diferente pH y fuerza iónica. El eluyente se mezcla con ninhidrina y se calienta a 100<sup>o</sup>C, produciendo una coloración azul, el cual se mide espectrofotométricamente a 270 nm y se gráfica automáticamente. (42)

b) Cromatografía de gases, se emplea en mezclas fisiológicas y se basa en la separación de aminoácidos, que forman ésteres alquílicos de aminoácidos al reaccionar con el aceto nitrilo y el anhídrido trifluoroacético, seguida de una filtración con diazometano la detección del derivado obtenido se realiza por ionización de llama o Espectrofotometría de masas con control iónico selectivo. Ambos métodos son tan sensibles, que logran detectar una nanomol (nmol) de aminoácidos (En nuestro caso de fenilalanina), en orina, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, etc..., pero no permiten ser utilizados para estudios masivos de diagnóstico, por su prolongado tiempo en cada prueba, su elevado costo y la complejidad del equipo. (42)

4) Electroforetica: En esta técnica se emplea papel whatman 3, que permite una eficiente separación de aminoácidos en un lapso máximo de 2 hr, en suero desproteinizado con etanol, en la cual se emplea un amortiguador de ácido fórmico/Ácido acético a pH de 2, con un potencial de hasta 2 kvolts, para la tinción de las bandas se utiliza ninhidrina y la identificación de los aminoácidos es individual mediante la comparación con sustancias marcadas de referencia, que se aplican en el mismo corrimiento electroforetico. (42)

1) Reacciones en Cadena de la Polimerasa (R.P.C.): Esta técnica de diagnóstico nos permite reproducir en el laboratorio cantidades elevadas de un segmento del gen, que se desea analizar ya que se encuentra en bajas cantidades en el material clínico.

Se realiza en 3 ciclos, cada ciclo consta de 3 pasos :

- I) Desnaturalización: Es la separación de las 2 cadenas de ADN.
- II) Apareamiento: Se realiza la unión de las cadenas con oligonucleótidos sintéticos específicos.
- III) Extensión: Síntesis de las nuevas cadenas de ADN complementarias a las originales.

Esta prueba logra amplificar de  $10^6-10^7$  el gen de interés y -posteriormente, se hace el análisis con enzimas de restricción y/o hibridaciones con sondas no radiactivas, con el fin de identificar la identidad del gen amplificado.(5)

### 3.-ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASA.

#### 3.1.Descubrimiento de los Componentes del Sistema Enzimático.

La demostración y comprensión de la conversión enzimática de la fenilalanina a tirosina, fue logrado con el descubrimiento de cada uno de los componentes del sistema enzimático, en donde participa la enzima fenilalanina hidroxilasa.

Uno de los primeros componentes es el NADPH, que cataliza la reacción en presencia de una coenzima natural, la THF como un segundo componente, el requerimiento de un donador de electrones en la reacción, fue demostrado por la presencia de oxígeno molecular, que en cantidades estequiométricas con el NADPH, es consumido en la reacción de hidroxilación.

Lo anterior lleva a la conclusión, de que la fenilalanina hidroxilasa, es una reacción de oxidación y que conjuntamente existe una regeneración del NADPH al tomar glucosa deshidrogenasa y glucosa del sistema cubriendo así las necesidades de NADPH requeridas para la reacción.(1)

peso molecular, el dímero se disocia en monómero al aumentar la temperatura de 0 a 30 °C, de aquí la importancia de la temperatura en la reacción, se ha observado que la temperatura óptima de trabajo de la enzima es de 25 a 27 °C (temperatura ambiente), evitando así la inactivación de ésta.(43)

Otro de los factores importantes en la reacción de hidroxilación es el valor de pH en el sistema ya que este nos da las especies reaccionantes. Las concentraciones de los componentes son de Micromoles ( $\mu\text{mol}$ ), por lo general en trabajos de reacciones enzimáticas se toma como referencia los valores o concentraciones fisiológicas, por lo que las concentraciones óptimas de reacción, son para fenilalanina 2.0  $\mu\text{moles}$ , NADH 0.25  $\mu\text{moles}$ , Buffer pH de 7.9, glucosa y glucosa deshidrogenasa, glucosa en exceso, observando también que la enzima es metaloenzima, que requiere la presencia de Fe (Hierro), para que sea completa su reacción (44)

### 3.4. Mecanismo de Acción.

Estudios cinéticos realizados, sobre la conversión de fenilalanina a tirosina concluyen, que es un complejo sistema que envuelve a fenilalanina, oxígeno, la enzima y THB, que sigue un mecanismo secuencial en agregación de los componentes del sistema de hidroxilación.(44)

### 3.5. Procesos de regulación de la Enzima Fenilalanina Hidroxilasa.

#### 3.5.1. Regulación in vitro.

La fenilalanina hidroxilasa purificada de hígado de rata, puede ser activada con  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP, proteincinasa y AMPc en una proporción de 2.5 a 3 veces. Se ha visto que cuando la enzima es activada en presencia de THB (Tetrahydrobiopterina), su cofactor natural y fosfolípidos (Lisolecitina) incrementan su actividad

### 3.2. Clasificación de Acuerdo a la IUB ( International Union of - Biochemistry).

La clasificación generalmente aceptada, es la planteada por la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) (55), que ha establecido una serie de reglas y tomaremos como ejemplo a la enzima fenilalanina hidroxilasa, que es el punto principal de este estudio:

- \*NOMBRE COMUN: Fenilalanina Hidroxilasa
- \*NOMBRE CIENTIFICO: fenilalanina-4-monooxigenasa.
- \*CLASIFICACION IUB: Ec. {1.14.16.1}

El número de clasificación se basa en lo siguiente:

- La primer cifra [1], corresponde a la clase de las Oxido - Reductasas.
- La segunda cifra [14], es porque representa a la subclase de las Oxido - Reductasas que utilizan a la coenzima NADH, como un sistema trasportador de electrones.
- La tercer cifra [16], porque representa a la sub-subclase de las Oxido - Reductasas, que utilizan pteridinas (Tetrahidropteridinas) como un donador, para la incorporación de un átomo de oxígeno.
- La cuarta cifra [1], se le asigna debido a que es la primer enzima de la sub-subclase de las Oxido - Reductasas. (55)

### 3.3. Propiedades Físicas y Químicas de la Fenilalanina Hidroxilasa.

La fenilalanina hidroxilasa obtenida de hígado de rata es de un 85 a 95% pura, estudios físicos indican que la enzima existe en múltiples formas, que difieren en peso molecular, carga y valor de Km, un monómero de 51,000 D - 55,000 D de peso molecular, un dímero de 110,000 D y un tetramero de 210,000 D de

de 30 a 50 veces su velocidad máxima. El aumento de la actividad en la enzima por la proteincinasa es proporcional a la cantidad de enzima agregada, sin embargo el máximo de activación es independiente de ésta. (43,44)

La activación de la fenilalanina hidroxilasa también es por medio de ATP (Adenosin trifosfato), AMPc (Adenosin Monofosfato Cíclico), sin eludir claro esta su cofactor natural THB. (43)

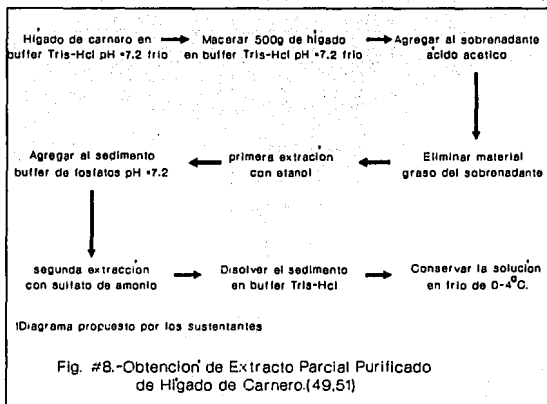
### 3.5.2. Procesos de regulación in vivo.

Se ha demostrado que la actividad catalítica de la fenilalanina hidroxilasa (in vivo), puede ser modificada por la adición de lisolecitina y de quimotripsina a hígado de rata, la reacción que se observa es una curva de saturación sigmoide, ambos activadores o reguladores aumentan a un máximo la velocidad y disminuyen el doble de la  $K_m$  en la reacción de hidroxilación.

Se sugiere que el papel que juegan la lisolecitina y la quimotripsina in vivo es regular la actividad durante daño al hígado con esto la actividad específica de fenilalanina hidroxilasa decrece con el aumento de la quimotripsina, inhibiéndose. (44)

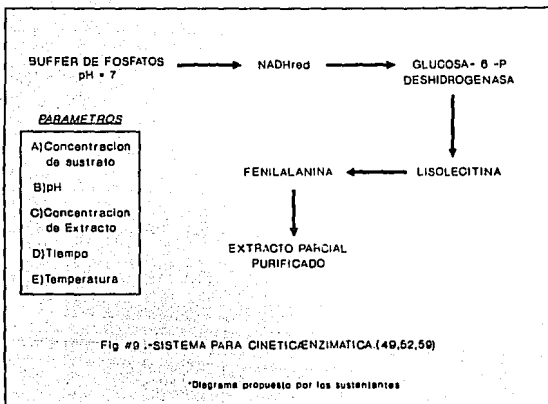
CAPITULO II: METODOLOGIA.

- a) Obtención de la enzima fenilalanina hidroxilasa a partir de hígado de carnero, proceso que se demuestra en la Fig.# 8.





b) Metodología general para la determinación de las condiciones de ensayo de la cinética de la fenilalanina hidroxilasa de extracto de hígado de carnero, en la Fig.# 9.



-Esta metodología se considera general, debido a que en cada parámetro se mantienen los mismos componentes del sistema es decir, que unicamente se fue variando el parámetro a determinar (Concentración de sustrato, ph, concentración de extracto, tiempo y temperatura). Los datos obtenidos de absorbancia corresponden a la medición en la variación de la reducción del NAD (Coenzima utilizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa), que absorbe a una longitud de 340 nm previamente determinada por una curva de barrido. (23)

1).- Para la determinación de la concentración optima de sustrato se manejaron las siguientes concentraciones : 0.5, 1, 1.5, 2, - 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 mM de fenilalanina.

Con las siguientes condiciones.

-Tiempo de incubación = 20 min.

-Temperatura = 27<sup>o</sup>C.

-Conc. de extracto = 47.92 mg/ml.

-Volumen de extracto = 1ml.

NOTA.- El intervalo de la concentración de fenilalanina se eligio en base a que a mayores concentraciones la actividad de la enzima se inhibe totalmente, efecto no deseado. (43,44,49)

2).- En la determinación de pH se manejaron las siguientes condiciones:

pH = 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9.

-{fenilalanina} = 1.5 mM.

-Tiempo de incubación = 20 min.

-Temperatura = 27<sup>o</sup>C

-Conc. de extracto = 47.92mg/ml.

-Vol.extracto = 1ml.

3).-En la determinación para conocer la concentración de extracto óptimo; se realizaron diluciones de extracto en orden de menor a la mayor concentración, que son las siguientes: 0.95, 2, 39, 5.32, 7.98, 11.98, 15.97, 23.96, 30, 35, 40, 47.92 mg de proteína.

Bajo las mismas condiciones de trabajo:

- Conc. de fenilalanina = 1.5mM.
- Tiempo de incubación = 20 min.
- Temperatura = 27<sup>0</sup>C .
- Vol. de extracto = 1ml.

4).-La determinación del tiempo óptimo de reacción, se realizó trabajando los siguientes tiempos: 0, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55 min.

- Conc. de fenilalanina = 1.5mM.
- Temperatura = 27<sup>0</sup>C.
- Vol. de extracto = 1ml.

5).-Para determinar la temperatura óptima de trabajo de la enzima se analizaron diferentes valores de temperatura, 10, 15, 20, 22, 25, 27.5, 30, 35, 40, 42.5 <sup>0</sup>C, observando el comportamiento de cada sistema.

### CAPITULO III: RESULTADOS.

#### CONCENTRACION DE PROTEINA EN EL EXTRACTO PARCIALMENTE PURIFICADO CON SULFATO DE AMONIO.

La concentración de proteína encontrada en el extracto de hígado de carnero se determinó por el método de Lowry, interpolando en una curva de calibración. (Tabla # 5) (43,44,47)

PURIFICACION	VOLUMEN (ml)	PROTEINA (mg)	CONC.DE PROTEINA (mg/ml)
Extracto	1500	46.030	30.68
Fracción de etanol	250	10.879	43.58
Fracción de (NH <sub>4</sub> )SO <sub>2</sub>	50	2.396	47.92

Tabla # 5.-Determinación de la concentración de proteína en el extracto parcial purificado por el método de Lowry.

En el presente estudio se muestran las condiciones de reacción de la enzima fenilalanina hidroxilasa(In vitro), de acuerdo a nuestras condiciones de trabajo, con el objeto de llegar a las condiciones finales de la reacción, como un prospecto para proponer una técnica de diagnóstico rápida, económica y con un grado de confiabilidad en los resultados.

Los datos obtenidos en la determinación en cada uno de los parámetros involucrados en la reacción enzimática(Concentración de sustrato [s], pH, concentración de extracto [Ext], tiempo y - temperatura son de Absorbancia(Abs).

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

La forma para determinar la concentración optima de sustrato(fenilalanina), se realizo midiendo el proceso 5 veces para cada concentración.(Tabla # 6).

[fenilalanina]	A1	A2	A3	A4	A5
0	0	0	0	0	0
0.5	0.229	0.229	0.232	0.232	0.232
1.0	0.318	0.320	0.322	0.323	0.322
1.5	0.326	0.327	0.330	0.331	0.330
2.0	0.335	0.336	0.337	0.335	0.338
2.5	0.341	0.342	0.345	0.346	0.345
3.0	0.349	0.350	0.353	0.354	0.353
3.5	0.359	0.358	0.358	0.359	0.358
4.0	0.365	0.366	0.365	0.366	0.367
4.5	0.374	0.374	0.377	0.376	0.375
5.0	0.383	0.384	0.383	0.383	0.384
5.5	0.392	0.391	0.392	0.392	0.393
6.0	0.394	0.393	0.394	0.394	0.396
6.5	0.395	0.395	0.396	0.396	0.396
7.0	0.395	0.395	0.396	0.396	0.396
7.5	0.395	0.395	0.396	0.396	0.396

Tabla # 6.-Lecturas de absorbancia para cada concentración de fenilalanina en las condiciones de ensayo.

En la Tabla #7 se representa el promedio del total de las lecturas de (Abs) obtenidas:

[fenilalanina]mM	Abs( $\bar{x}$ )	[fenilalanina]mM	Abs( $\bar{x}$ )
0	0	4.0	0.366
0.5	0.230	4.5	0.375
1.0	0.320	5.0	0.383
1.5	0.328	5.5	0.392
2.0	0.335	6.0	0.394
2.5	0.343	6.5	0.396
3.0	0.351	7.0	0.396
3.5	0.358	7.5	0.396

Tabla # 7.Efecto de la concentración de sustrato vs Absorbancia (Lecturas promedio).

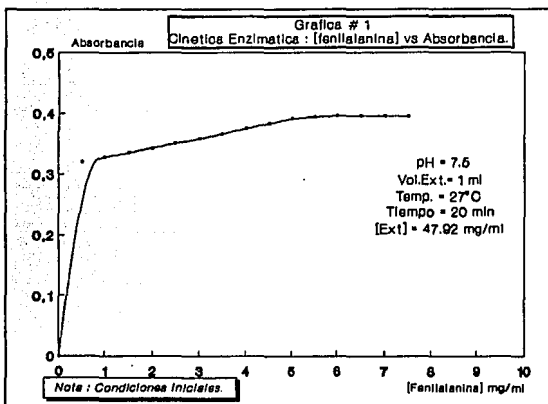
-Análisis Estadístico.

$$\bar{x} = 0.358, \quad n-1 = 0.044.$$

Error Estandar (E.S.) = 0.011.

Coefficiente de Variación (C.V.) = 12.35%

La gráfica # 1 correspondiente a los datos anteriores es :



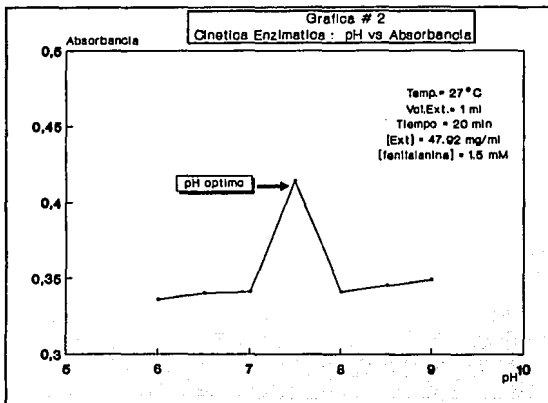
### EFFECTO DEL pH

Uno de los parámetros determinantes en la cinética enzimática es la influencia del pH del medio de reacción, que experimentalmente nos dio los siguientes resultados (Tabla # 8).

pH	Abs.
6.0	0.336
6.5	0.340
7.0	0.341
7.5	0.414
8.0	0.341
8.5	0.345
9.0	0.349

Tabla # 8.-Efecto de pH vs Absorbancia.

Estos resultados se representan en la gráfica # 2 :



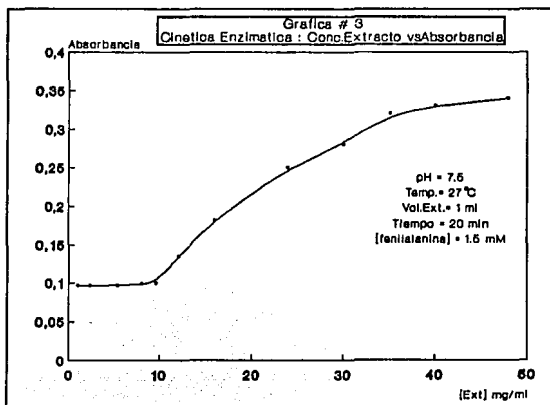


### EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTO

La concentración de extracto [Ext] óptima en donde se lleva a cabo la máxima actividad de la enzima fenilalanina hidroxilasa, - se obtuvo de los siguientes resultados: (Tabla # 9)

[Ext]mg/ml	Abs.	[Ext]mg/ml	Abs.
0.95	0.097	15.97	0.182
2.39	0.097	23.96	0.250
5.32	0.097	30.00	0.280
7.98	0.099	35.00	0.320
9.58	0.100	40.00	0.330
11.98	0.135	47.92	0.340

Tabla # 9.-Efecto de la concentración de extracto vs Absorbancia.  
La gráfica # 3 obtenida es la siguiente:



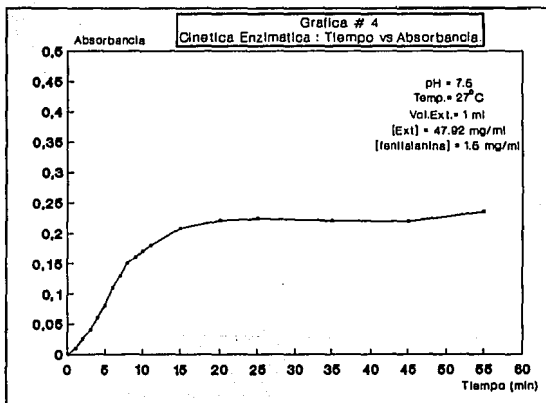
### EFFECTO DEL TIEMPO

El tiempo óptimo para nuestra cinética de reacción, fue determinado utilizando un rango de 0-55 minutos, obteniéndose la siguiente tabla #10:

Tiempo (min)	Abs.	Tiempo(min)	Abs.
0	0	11	0.18
1	0.01	12	0.19
2	0.03	15	0.20
3	0.04	20	0.22
4	0.06	25	0.22
5	0.08	35	0.22
6	0.10	45	0.21
7	0.13	55	0.23
8	0.12		
9	0.14		
10	0.16		

Tabla #10.- Efecto del Tiempo vs Absorbancia.

La gráfica # 4 que corresponde a estos datos es:



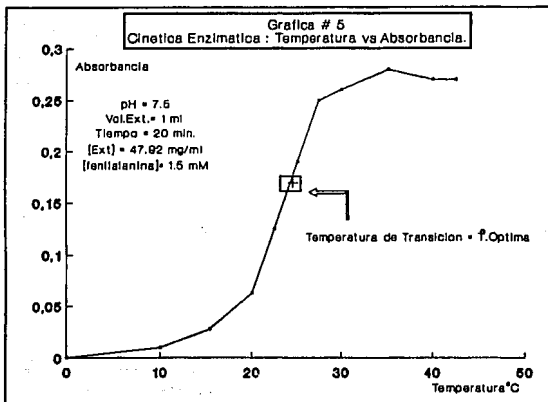
### EFEECTO DE LA TEMPERATURA

Para determinar la temperatura optima de reacción, se trabajo en un rango de temperatura de 10-45 °C, los datos obtenidos se encuentran en la tabla siguiente: (Tabla # 11)

Temperatura(°C)	Abs.
10	0.01
15.5	0.028
20	0.063
22.5	0.125
25	0.190
27.5	0.280
30	0.280
35	0.260
40	0.270
45	0.270

Tabla # 11.-Efecto de temperatura vs Absorbancia.

y la gráfica # 5 es la representativa de esta variable :



Los resultados obtenidos al realizar la cinética con los parámetros óptimos del ensayo ([S], pH, [Ext], tiempo y - Temperatura) que intervienen en la reacción enzimática, se muestran en la tabla siguiente, en 5 determinaciones realizadas: (Tabla # 12)

[fenilalanina]	A1	A2	A3	A4	A5
0	0	0	0	0	0
0.25	0.083	0.084	0.083	0.082	0.083
0.50	0.165	0.166	0.164	0.165	0.167
0.75	0.241	0.242	0.239	0.240	0.241
1.0	0.302	0.297	0.299	0.301	0.299

Tabla # 12. Lecturas de Absorbancia para cada concentración de fenilalanina en el rango de 0-1 mM.

y las lecturas promedio son: (Tabla # 13)

[Fenilalanina]	Abs. ( $\bar{x}$ )
0	0
0.25	0.083
0.50	0.165
0.75	0.240
1.00	0.300

Tabla # 13.- Efecto de la concentración de fenilalanina vs - Absorbancia en las condiciones finales (Lecturas promedio).

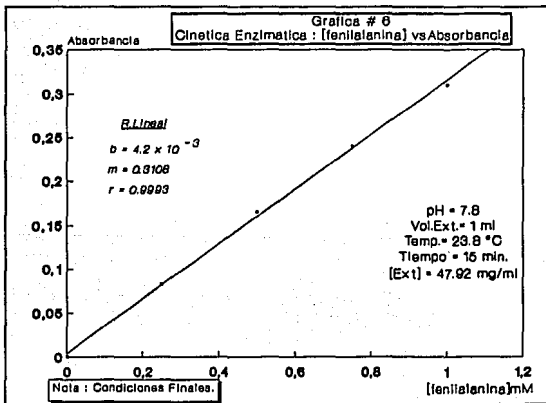
-Análisis Estadístico.

$x=0.158$  ,  $n=0.120$ .

Error Estándar ( E.S. ) = 0.054.

Coefficiente de Variación ( C.V. ) = 75.90%

La gráfica # 6 corresponde a estos resultados y es la siguiente:



#### CAPITULO IV : ANALISIS DE RESULTADOS

Del análisis de resultados con respecto a la concentración de proteína presente en el extracto parcial purificado de hígado de carnero, se puede observar que se tiene una concentración máxima de proteína de 47.92 mg/ml, que fue determinada por el método de Lowry(86). En el desarrollo del estudio cinético de una enzima es importante el control estricto de todos los parámetros involucrados en la reacción.

Para comenzar el análisis de los resultados obtenidos, el primer parámetro a tratar fue la de concentración de [sustrato] y mediante la obtención de la curva de [fenilalanina] vs Abs, nos permite analizar la actividad de la enzima, en la gráfica se observa un incremento constante de la actividad enzimática en el rango de concentraciones de 0-1.5mM, y que después a concentraciones mayores a este rango se produce una disminución de la reacción, nosotros suponemos, que este comportamiento se debe a la saturación de la enzima por altas concentraciones de fenilalanina, por lo cual esta reacción tiene un comportamiento, de acuerdo a una cinética de Michaelis-Menten, que gráficamente se representa como una curva hiperbólica rectangular(44).

El siguiente parámetro, que se determinó fue el pH, que de acuerdo a lo resultados obtenidos el pH óptimo de la cinética de reacción, es de 7.4 por lo cual nosotros deducimos que el rango de pH, donde se puede llevar a cabo la reacción es de 6.8-7.5, en el cual se esta contemplando que la enzima no sufra un proceso de desnaturalización y así produciendose la inactivación de la enzima, como se puede contemplar gráficamente en los extremos de valores de pH ácidos y básicos.

Con lo que respecta a la gráfica obtenida en la determinación de la concentración de extracto óptimo se hace notar, que a partir de la concentración de 25 mg/ml, la actividad de la enzima empieza a incrementarse en forma proporcional después de este



punto por lo tanto inferimos, que la mayor actividad de la enzima corresponde a la concentración de 47.92 mg/ml del extracto parcial purificado.

El factor tiempo, en la cinética de reacción es importante controlarlo, para evitar un posible efecto de inhibición, que influya en la determinación enzimática, por lo cual es necesario darle un intervalo de tiempo adecuado a la reacción para que se realice totalmente, esto se refiere al lapso de tiempo de reacción, que de acuerdo a la gráfica obtenida este intervalo le corresponde como punto medio a 15 minutos, por lo que consideramos, que este lapso de tiempo no es tan prolongado en comparación con otras determinaciones enzimáticas. (43)

La influencia que ejerce la temperatura en una cinética enzimática es determinante, como se puede observar en la gráfica de temperatura vs Abs., existe un rango de temperatura en donde la actividad de la enzima es proporcional hasta alcanzar un punto medio, como se puede observar en la gráfica que corresponde al valor de  $23.8^{\circ}\text{C}$ , la que consideramos como la temperatura óptima de reacción, es importante aclarar que la curva obtenida difiere bastante al de una cinética normal, donde la curva tiene la forma de una campana y la temperatura óptima corresponde al punto máximo de la curva de reacción(55) en nuestro caso la curva obtenida es sinoidal, por lo tanto la temperatura óptima se encuentra en la parte media de la curva mediante el trazo de dos líneas paralelas en el punto mínimo y máximo de la curva como se puede observar en la gráfica # 5 y que en la literatura se le considera realmente como Temperatura de transición, que se define como la temperatura, donde se tiene la máxima actividad enzimática antes de que la enzima tenga un proceso de desnaturalización(44).

Después de haber realizado la interpretación de cada uno de los parámetros involucrados en la cinética de fenilalanina hidroxilasa (Concentración de sustrato, pH, conc. de extracto, tiempo y temperatura), con el fin de determinar las condiciones finales de reacción, la relación experimental que pone de manifiesto en forma general la actividad de la enzima fenilalanina hidroxilasa, es la relación de [fenilalanina] vs absorbancia, por lo cual podemos mencionar lo siguiente:

1) La influencia de los parámetros de reacción (Condiciones finales), nos permite analizar el comportamiento de la actividad de la enzima debido a la relación proporcional, que existe entre la propiedad obtenida (Abs.) y la variación de sustrato.

2) El hecho de proponer el rango de concentraciones de fenilalanina de 0-1.5 mM, se debe principalmente a que en este intervalo de concentraciones tenemos la etapa más representativa de la reacción, es decir que de alguna manera estamos asegurando, que la medición de la actividad de la enzima no se esta contemplando el estado de saturación de la enzima o en su defecto la inhibición de la actividad por altas concentraciones de sustrato y gráficamente hablando nos referimos a la inclinación de la curva hiperbólica en la relación de [s] vs Absorbancia.

3) Al tener una relación proporcional o lineal entre las variables antes mencionadas, nos permite llevar a cabo el cálculo de los parámetros cinéticos mediante el uso de los modelos matemáticos propuesto teóricamente y que nos dan otro punto de vista que complementa la parte experimental de la cinética enzimática, por ejemplo la velocidad inicial ( $V_i$ ), orden de reacción, velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), velocidad media ( $V_{i/2}$ ), etc...

### VELOCIDADES INICIALES

La velocidad inicial ( $V_i$ ), se define como la cantidad de producto formado en la reacción por un lapso de tiempo determinado, en nuestro caso la velocidad inicial la definimos como: La relación de la variación de la concentración de sustrato (fenilalanina) en función de la absorbancia en relación al consumo de cofactor NADH por unidad de tiempo (óptimo). (51)

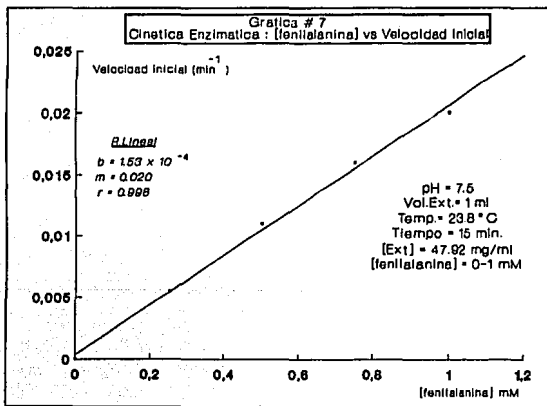
### CALCULO DE LAS VELOCIDADES INICIALES DE LA CINÉTICA DE LA FENILALANINA HIDROXILASA

El cálculo de las velocidades iniciales ( $V_i$ ) se calcularon a partir de la división de la Absorbancia obtenida entre el tiempo de reacción final, estos resultados son reportados en la siguiente tabla: (47)

[fenilalanina]mM	$V_i(\text{min}^{-1})$
0	0
0.25	0.005
0.50	0.011
0.75	0.016
1.00	0.020

Tabla # 14.-Velocidades iniciales de la cinética de la fenilalanina hidroxilasa.

y en la gráfica #7 tenemos lo siguiente:



La determinación de las velocidades iniciales, permite analizar gráficamente el comportamiento de la actividad de la enzima durante el trascurso de la reacción en relación con el sustrato, como se puede observar en la gráfica [S] - Vi, la linealidad indica como la velocidad es proporcional al aumento en la concentración de fenilalanina es decir que, ningún otro factor diferente a la concentración de sustrato [S], limita la velocidad dentro del intervalo de 0 - 1 mM de fenilalanina, pero después de este intervalo la cantidad de enzima disponible en la muestra de reacción, es el factor limitante porque el sustrato ha saturado el proceso enzimático, por lo que apenas es posible aumentar más la velocidad, a este punto se le conoce como la Vmáx. de la reacción. (17)

La velocidad máxima (Vmáx), se define como el más alto valor de la velocidad, que puede obtenerse incrementando la concentración de sustrato, de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten (55) :

$$V = V_{máx} \cdot [S] / K_m + [S]$$

donde:

V = Vel.inicial.

Vmáx = Vel.máxima.

Km = Constante de Michaelis.

[S] = Concentración de sustrato.

En donde los valores de estas constantes se determinan de 2 formas:

- 1).- Gráficamente interpolando los puntos correspondientes de Vmáx, Vmedia máxima y Km en la gráfica de [S] vs V inicial.
- 2).- Mediante la relación recíproca (inversa) de la ecuación de Michaelis-Menten. (19,59,77)

-Con lo que respecta al inciso 1) tenemos, que el valor de  $V_{m\acute{a}x}$  es interpolando en la gráfica, el valor mas elevado y la  $K_m$  es la mitad de la velocidad  $V_{m\acute{a}x}$ , pero surge un inconveniente por el cual este método grafico no es el mas recomendable para la determinación de las constantes, si analizamos la gráfica [fenilalanina] vs Abs.; el comportamiento grafico es el de una curva hiperbolica rectangular, por lo tanto si se calculara las constantes mediante la interpolación en la curva implicaría un elevado error, debido a que los valores obtenidos no son representativos de la cinética, es decir conforme se va llegando a la asintota de la curva (Inclinación), no es preciso determinar exactamente la concentración real de sustrato, que corresponde a la  $V_{m\acute{a}x}$ , conforme se va acercando a la estabilidad de la curva.

-En el inciso 2), lo que se propone es precisamente un método de linealización, que permite calcular lo mas exacto posible el valor de la  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $V(1/2)$  media y  $K_m$ .

Uno de los métodos, es la representación del inverso de la ecuación de Michaelis-Menten, a la cual se le denomina como representación de Lineweaver -Burk, que se expresa de la siguiente manera:(17)

$$1/V = (K_m/V_{m\acute{a}x}) \cdot (1/[S]) + 1/V_{m\acute{a}x}.$$

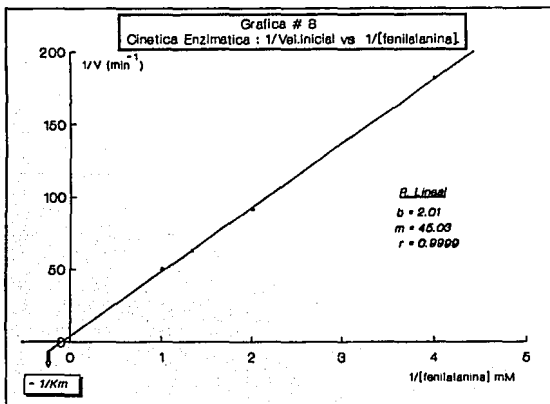
como una transformación lineal, si lo representamos de acuerdo a la ecuación general de la recta,  $Y = mx + b$  entonces:(19)

$$y = 1/V \quad x = 1/[S] \quad m = K_m/v_{m\acute{a}x} \quad b = 1/V_{m\acute{a}x}.$$

y los datos obtenidos a partir de la relación  $1/[S]$  vs  $1/V_i$ , - se representan en la tabla siguiente:

1/[S]	1/Vi
0	0
4	181.81
2	90.90
1.3	62.50
1	50.00

Tabla # 15.-Relación reciproca de la ecuación de Michaelis-Menten. y su representación es la gráfica # 8:



es decir:

$$b = 1/V_{m\acute{a}x} \text{ ----- } V_{m\acute{a}x} = 1/b = 1/2.378 = 0.4205 \text{ min}^{-1}$$

$$V_i/2m\acute{a}x = V_{m\acute{a}x}/2 = 0.4205 \text{ min}^{-1}/2 = 0.2102 \text{ min}^{-1}$$

$$m = Km/V_{m\acute{a}x} \text{ ----- despejando } Km :$$

$$Km = (m) (V_{m\acute{a}x}) = (44.97 \text{ mM}^{-1}) (0.4205 \text{ min}^{-1})$$

$$Km = 18.9 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

Donde la  $K_m$ , se define como la concentración de sustrato, que permite alcanzar la mitad de la velocidad máxima, por lo tanto es la constante, que permite calcular la actividad enzimática. (17)

#### DETERMINACION DEL ORDEN DE REACCION

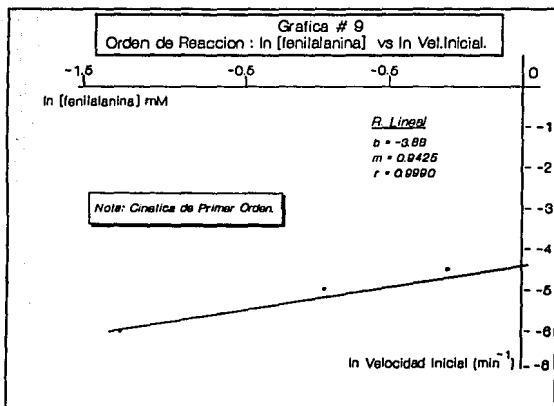
Para conocer el orden de reacción de la enzima fenilalanina hidroxilasa a nuestras condiciones de trabajo, se determinó por el método de velocidades iniciales, mediante la relación de  $\ln$  [fenilalanina] vs  $\ln$  de la velocidad inicial ( $V_i$ ), obteniéndose la Tabla # 16. (43)

$\ln$ [fenilalanina]	$\ln V_i$
-1.38	-5.2
-0.68	-4.5
-0.28	-4.13
0	-3.91

Tabla # 16.-Determinación del orden de reacción.



y se representa en la gráfica # 9:



Para la determinación del orden de reacción, que se define de acuerdo a la ecuación de la velocidad como un modelo matemático de la cinética de la reacción, que tiene valores enteros de 1,2,3, que nos permite evaluar la relación que existe entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato, en resumen la actividad enzimática, por lo cual la determinación del orden de reacción se cálculo mediante el método de velocidades iniciales (38), que toma en cuenta los resultados de velocidades iniciales y la concentración de fenilalanina, que sacando  $\ln a -$  ambos parámetros, nos permitio determinar el orden de reacción y que debe cumplir ciertas características:

a).- La relación gráfica debe ser lineal.

b).- Con una pendiente positiva.

Por lo tanto nuestra reacción corresponde a una cinética de primer orden, como se puede deducir de la gráfica y conforme a los puntos antes mencionados.

#### ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FENILALANINA HIDROXILASA

Para el calculo de la actividad enzimática de la fenilalanina hidroxilasa, se tomo como base el valor de  $K_m$  obtenido a partir de la reciproca de la ecuación de Michaelis - Menten.(55)

La actividad enzimática se puede reportar de 2 maneras:  
(43,44,45)

1).- Unidades Internacionales(UI).

$$UI = (K_m)(10^3) (Vt) / \xi NADH (l) (Vm)$$

$K_m$  = Valor de cts. de Michaelis. =  $18.90 \text{ mmol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$

$10^3$  = factor de conversión de  $\text{mmol}$  a  $\mu\text{mol}$ .

$V_t$  = Volumen total del sistema =  $2.3 \text{ ml}$

$\epsilon_{\text{NADH}}$  = Coeficiente de absorptividad molar del NADH a  $340\text{m}\mu$ , reportado de  $6.3 (\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ .

$l$  = Paso del haz de luz de la celda  $1\text{cm}$ .

$V_m$  = Volumen de muestra =  $1 \text{ ml}$

Sustituyendo estos valores en la ecuación:

$$UI = (18.90 \text{ mmol l}^{-1} \text{ min}^{-1}) (10^3) (2.3 \text{ ml}) / (6.31 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) (1 \text{ cm}) (1 \text{ ml}).$$

$UI = 6929.20 \mu\text{mol/min} / 47.92 \text{ mg/ml} = 144.59 \text{ U/L/mg}$  de extracto parcial purificado.

$144.59 \text{ U/L/mg/ml}$  de extracto parcial purificado de hígado de carnero, a  $\text{pH} = 7.4$ , y  $23.8^\circ \text{C}$  en  $15 \text{ min}$ .

2).- Por nanokatalas:

Si  $1 \text{ UI}$  equivale a  $16.67 \text{ nkat}$ , mediante un factor de conversión:

$$1 \text{ UI} \text{-----} 16.67 \text{ nkat}$$

$$6929.20 \text{ UI} \text{-----} X = 115509.79 \text{ nkat}$$

Actividad de la fenilalanina hidroxilasa =  $115509.76 \text{ nkat}$

47.92 mg/ml

Actividad de la fenilalanina hidroxilasa =  $2410.47 \text{ nkat/mg}$  de extracto de proteína parcial purificado.

$2410.47 \text{ nkat/mg}$  de proteína de extracto parcial purificado de hígado de carnero, a  $\text{pH} = 7.4$ , y  $23.8^\circ \text{C}$  en  $15 \text{ min}$ .

ANALISIS HIPOTETICO DE LA GRAFICA [fenilalanina] vs [NADH]

Después de haber analizado la relación [fenilalanina] vs Abs. para determinar la cinética enzimática de la fenilalanina hidroxilasa nos demuestra, que importancia tiene la coenzima NADH, debido a que la Absorbancia obtenida esta en función del NADH utilizado por la enzima durante la reacción. (73)

Por lo cual consideramos importante demostrar, que relación existe entre la propiedad y el NADH utilizado por la enzima.

Para explicar esta cuestión se propone un modelo matemático, - que permita demostrar desde un punto de vista hipotético, como se lleva a cabo esta relación y que es el siguiente:

$$P = \xi \mu [x] \dots (1) \text{ donde:}$$

P: Propiedad medida.

$\xi$ : Coeficiente de Absortividad Molar.

$\mu$ : Paso del haz de luz de la celda.

[x]: Concentración de la sustancia a medir.

$$A = \xi l [\text{fenilalanina}] \dots (2)$$

A : Absorbancia total del sistema.

$\xi$ : Coeficiente de Absortividad Molar.

l : Paso del haz de luz de la celda.

[fenilalanina] : Conc. de fenilalanina.

$$\text{Si } A = A\phi + A_r \dots (3), \text{ donde:}$$

$A\phi$  = Abs. de fenilalanina.

$A_r$  = Abs. de tirosina (Al ser tan baja se considera despreciable).

$$\text{Entonces : } A\phi = \xi l [\text{fenilalanina}] - \xi l [\text{NAD}] \dots (4)$$

[NAD] = Se refiere a la especie de la coenzima en su estado reducido.

$$\text{donde tenemos que: } A_{\text{NAD}} = \xi l [\text{NAD}] \dots (5)$$

despejando  $\epsilon_2$  de ec. (5):

$$\epsilon_2 = \frac{ANAD}{l[NAD]} \dots (6)$$

sustituyendo (6) en (4):

$$A\phi = \epsilon_1[\text{fenilalanina}] - [NAD] \frac{ANAD}{l[NAD]}$$

eliminando terminos,  $l=1$ :

$$A\phi = \epsilon_1[\text{fenilalanina}] - ANAD \dots (7)$$

despejando ANAD:

$$ANAD = \epsilon_1[\text{fenilalanina}] - A\phi \dots (8)$$

Se procede a calcular ANAD, para cada [fenilalanina] obteniéndose la siguiente tabla de resultados:

[fenilalanina]mM	ANADx 10 <sup>-3</sup>
0	0
0.25	-4.75
0.50	-9.5
0.75	-6.75
1.00	1.00

Tabla # 17.-Relación hipotetica de la concentración de fenilalanina vs ANAD (Absorbancia que corresponde al NAD reducido con respecto a la fenilalanina).

$$\text{Si } A = A'\phi = A\phi + ANAD \dots (9)$$

donde  $A'\phi$ : Absorbancia real, que corresponde a la [fenilalanina], que se transforma a Tirosina, por lo tanto se calcula la  $A'\phi$ , para cada valor de ANAD, obteniéndose la siguiente tabla de resultados:

[fenilalanina]mM	ANADx 10 <sup>-3</sup>	A'φ
0	0	0
0.25	-4.75	0.077
0.50	-9.5	0.155
0.75	-6.75	0.233
1.00	1.00	0.311

Tabla # 18.-Relación hipotética de fenilalanina vs A'φ (Absorbancia real de la transformación de fenilalanina a tirosina).

entonces si  $\xi_1 = \xi_2$ , la ec.(10), queda expresada de la siguiente manera:

$$A\phi = \xi_{1i} [\text{fenilalanina}] - \xi_{1i} [\text{NAD}] \dots (10)$$

donde  $\xi_1 = 0.311$  y  $i = 1$ .

(Valor correspondiente al de la pendiente de la gráfica [fenilalanina] vs Abs.).

de la ec.(10) despejamos la [NAD]:

$$[\text{NAD}] = \xi_{1i} [\text{fenilalanina}] - A'\phi / \xi_{1i} \dots (11)$$

reordenando terminos:

$$[\text{NAD}] = \frac{\xi_{1i} [\text{fenilalanina}] - A'\phi}{\xi_{1i}}$$

eliminando terminos:

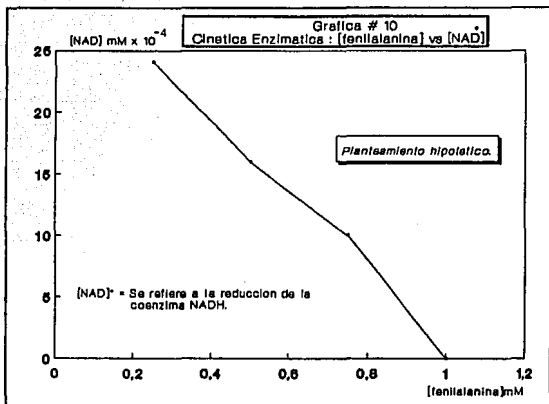
$$[\text{NAD}] = [\text{fenilalanina}] - \frac{A'\phi}{\xi_{1i}} \dots (12)$$

se procede a calcular la [NAD] para cada valor de [fenilalanina] obteniéndose la siguiente tabla de resultados y su gráfica correspondiente es: (Tabla # 19) gráfica # 10)

[fenilalanina]mM	[NAD] $\times 10^{-4}$ mM
0.25	24.1
0.50	16.0
0.75	8.0
1.00	0

Tabla # 19.-Relación hipotética de la concentración de fenilalanina vs la concentración de NAD.

y la gráfica # 10 es:



Analizando el comportamiento de la gráfica obtenida tenemos que la relación de [fenilalanina] vs [NAD] es proporcional, lo que significa que la propiedad obtenida, es equimolar con la concentración de fenilalanina y por lo tanto es proporcional a la actividad de la enzima con respecto al NADH utilizado.



## CONCLUSIONES

-En el presente estudio, se llevo a cabo la cinética enzimática de la enzima fenilalanina hidroxilasa [1.14.16.1], determinandose las condiciones finales del método de ensayo

\* CONCENTRACION DE FENILALANINA = 0 - 1.5 mM.

\* pH = 7.4

\* CONCENTRACION DE EXTRACTO = 47.92 mg/ml.

\* VOLUMEN DE EXTRACTO = 1 ml.

\* TIEMPO = 15 minutos.

\* TEMPERATURA = 23.8 °C (Aprox. 24°C).

Los resultados obtenidos correspondientes a este punto, permiten, que la técnica experimental se desarrolle adecuadamente a las condiciones de laboratorio.

-El orden de reacción de la cinética de la fenilalanina hidroxilasa en base a los resultados obtenidos, es una cinética de reacción de primer orden.

-La relación [fenilalanina] vs Abs., presenta un comportamiento grafico de acuerdo a la de una cinética de primer orden que se ajusta a la Ec. de Michaelis-Menten.

-Con respecto a la Espectrofotometría de Absorción, técnica utilizada para la medición de la propiedad, que en si se refiere a la reducción de la coenzima NADH podemos mencionar, que una de las condiciones primordiales para utilizar esta técnica, es el comportamiento que siguió nuestra cinética, que se ajusta al modelo de Lambert y Beer es decir que la relación entre la propiedad medida y la [fenilalanina] sea proporcional y que se explica por medio de la ecuación de la recta, por lo tanto se considero pertinente demostrarlo mediante un modelo hipotético que nos confirma de esta manera la relación de [fenilalanina] vs [NADH]<sub>reducido</sub>, a una longitud de onda de 340 nm.

-La actividad de la enzima fenilalanina hidroxilasa, evaluada en el extracto parcial purificado de hígado de carnero es de :

Fenilalanina Hidroxilasa (U.I.) = 144.49 U/L/mg de proteína.

Fenilalanina Hidroxilasa (nkat) = 2410.47 nkat/mg de proteína.

-Por ultimo se concluye, que el trabajo experimental realizado cumple con los objetivos propuestos, siendo necesario enfatizar, que el estudio es apenas un precedente para la proposición de otros modelos experimentales, que se basarían principalmente en el análisis del comportamiento cinético de la fenilalanina hidroxilasa con diferentes fluidos (suero o plasma), ya que este trabajo se limito al estudio en general del comportamiento de la enzima a ciertas condiciones de trabajo en extracto de hígado de carnero, que serían las bases para el objetivo final de llegar a la implementación de una prueba de diagnóstico, que sea confiable reproducible, sensible, que nos permita la evaluación de los procesos patológicos relacionados con la enzima fenilalanina hidroxilasa principalmente en la hiperfenilalaninemia clásica tipo I (Fenilcetonuria).

#### REFERENCIAS

- 1.-Abita.J.P.,Hilstien.S.,Chong,et al,"In vitro activation of rat liver phenylalanine hidroxilase by phosphorylation" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.251, No.17, (1976), pp.5310-5314.
- 2.-Anderson.L., Dublle.M.V. y Turkki.P.R., "Nutrición y dieta de Cooper.", Ed.Interamericana., 17a.ed., D.F., México., (1968). pp.690-698.
- 3.-Ambrose.J.A., and Sullivan.P.S., "Cuantification aminoacids to liquids corporis of error innates metabolism"., CLINICAL CHEMICAL ACTA., vol.15, (1967), pp.493.
- 4.-Arias.I.H., and Cohem.L.M., "Chonic no hemolytic unconjugated hyperbilirrubinemia with hepatic glucaronyl transferase deficiency: Evidence for genetic heterogeneity"., TRANS.ASS.AMER. PHYSICIANS., vol.81, (1968), pp.66.
- 5.-Barrera.A.H., Gonzalez.L.M., Rivera.A.J. y col., "Genética molecular en México"., CIENCIA Y DESARROLLO., vol.XVIII., - No.101., (1991). pp.68-79.
- 6.-Beadle.G.W., and Tatum.E.L., "Genetic control of biochemical reactions inmetabolism necrospora"., PROC.NAT.ACAD. SCI.vol.127., (1941)., pp.499-501.
- 7.-Benzers.l., "Thechemical basis of heredity"., Ed.McEroy and Glass. Baltimor. U.S.A., (1957)., pp.70.
- 8.-Berry.H.K., Cripps.R.N., Nichols.K., "Development of phenylalanine hidroxylase activity in Guinea pig liver"., BIOCHIM. BIOPHYS.ACTA.vol.261., (1972)., pp.315-320.
- 9.-Bessman.P.S. and Underfriend.S."The hydroxylation of phenylalanine and antipyrine in phenylpyruvic oligophrenia"., - THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.203., (1953), - pp.961-966.
- 10.-Boyle.J.A., and Paivio.K.O., "Lesch-Nyham syndrome preventive control by prenatal diagnosis"., SCIENCE., vol.169., (1970). pp.688.

- 11.-Butler.J.I.O'Flynn.E.H., Seifer.E.W.and Howell.R.R., "Neuro -  
transmitter and treatment of disorders of hyperphenylalani -  
nemia".THE JOURNAL OF PEDIATRICS.,vol.98.,No.5., May (1981).  
pp.729-733.
- 12.-Choi.T.B., Pardridge.W.H., "Phenylalanine transport at the  
human blood brain barrier"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHE-  
MISTRYvol.261,No.14.,(1986).,pp.6536-6541.
- 13.-Cooper.J., Bloom.E.F.and Roth.H.R., "Las bases bioquímicas  
de la neurofarmacología"., Ed. El manual moderno.,  
2a.ed., D.F. , México.D.F., (1982)., pp.89-154.
- 14.-Cuatrecasas.P., "Topography of the active site of staphyloco-  
cal nucleasa affinity labeling with diazonium substrate ana-  
logues".J.BIOL.CHEM., vol.245., (1970)., pp.574.
- 15.-Dahl.H-H.M.,and Mercer.J.F.B., "Isolation and sequence of a -  
cDNA clone which contains the complete coding region of rat  
phenylalanine hidroxilasa"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHE-  
MISTRY., vol.261.No.9.,(1986)., pp.4148-4153.
- 16.-Danes.B.S., "Cell cultures and genetic disease"., HOSP.  
PRACT.,vol.,4., (1969)., pp.88.
- 17.-Devlin.T.M., "Bioquímica"., Ed.Reverté., Tomo.1., Barcelona  
España., (1985)., pp.560-564.
- 18.-Dianzani.I., Devoto.M., Camaschella.C., Saglio.G., Ferrero.  
B.G."Haplotype distribution and molecular defects at the  
phenylalanine hydroxylase locus in Italy"., HUM. GENET.  
vol.86., (1990) pp.69-72.
- 19.-Diaz Zagoya Juan.C., "Bioquímica e Inmunología".,Ed., Piensa  
México.D.F., (1988)., vol.I, II., pp.520-521, 527, 279-282.
- 20.-Dilella.G.A., Marvit.J., Lideky.S.A., Gutler.F., "Tight linkage  
between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in  
phenylketonuria"., NATURE., vol.322.,No.28, August (1986).  
pp.799-809.
- 21.-Donlon.J., Kaufman.S., "Glucagon stimulation of rat hepatic  
phenylalaninehidroxilase throug phosphorylation in vivo".  
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.253., No.19., -  
(1978).pp.6657-6659.

- 22.-Ephrussi, B., "Chemistry of eye color hormones of drosophila." QUART. REV. BIOL., vol. 17., (1942), pp. 327-330.
- 23.-Fisher. B.D., Kaufman. S., "The stimulation of rat liver phenylalanine hidroxilase by lysolecithin and  $\alpha$ -chymotrip tripsin"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 248., - No. 12., (1973). pp. 4345-4353.
- 24.-Fisher. B.D., Kaufman. S., "The stimulation of rat liver phenylalanine hydroxylase by phospholipids"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol., 247., No. 7., (1972). pp. 2250-2252.
- 25.-Fisher. B.D., Kirwood. R., Kaufman. S., "Rat liver phenylalanine hidroxilase on iron enzyme"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 247., No. 16., (1972)., pp. 5161-5167.
- 26.-Polin. O., Ciocalteu. V., "On tyrosine and tryptophane de - terminations in proteins"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 163, (1927)., pp. 627-650.
- 27.-Frederick. E.W., Rabkin. T., "Primary hiperoxaluria: a defect in glioxylate metabolism"., J. CLIN. INVEST, vol. 41., (19). pp. 1358.
- 28.-Gardner. J.E., "Principles of genetics"., Ed. Jhon Wiley and Sons. 5a. ed., New york. U.S.A., (1975)., pp. 256, 526-527.
- 29.-Garrod. A.E., "A contribution to the study of alcaptonuria: A study in chemucal individuality"., LANCET., vol. 2, (1902). pp. 130.
- 30.-Garrod. A.E., "Inborn errors of metabolism (Croonian Lectures)" LANCET., vol. 2., (1908)., pp. 1, 73, 142, 214.
- 31.-Garrod. A.E., "Inborn errors of metabolism"., Oxford, New England, (1923)., pp. 343-356.
- 32.-Graff. Laurine., "Analisis de orina"., Ed. Medica panamericana Buenos Aires, Argentina., (1983)., pp. 196-201.
- 33.-Heard. S.G., Mc voy. S.R.J., "A screening method for biotinidase deficiency in newborns"., CLIN. CHEM., vol. 30., No. 1. (1984)., pp. 125-127.
- 34.-Herskowitz. H. Irwin., "Genética". Ed. Continental., México. - D.F., (1982)., pp. 238-239, 468-239.

- 35.-Hilton.A.M., Sharpe.N.J., Hicks.G.L., Adreus.F.B., "A simple method for detection of heterozygous carriers of the gene for classic phenylketonuria"., THE JOURNAL OF PEDIATRICS., vol.109., No.4, (1986)., pp.601-604.
- 36.-Hotzman.N.A., "Dietary treatment of inborn errors of metabolism"., ANN.REV.MED., vol.21., (1970)., pp.335.
- 37.-Hsia.D.Y., "Study of heredity metabolic disease using in vitro techniques"., METABOLISM., vol.19., (1970)., pp.309.
- 38.-Huang.Y.Charles., Kaufman.Seymour., "Notes on the mechanisms of action of phenylalanine hydroxylase"., THE JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.245., (1973)., pp.4242-4251.
- 39.-Ikeda.M., Faihen.A.L.b Udenfriend.S., "Kinetic study of bovine adrenal tyrosine hidroxilase"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.241., No.19., (1966). pp.4452-4456.
- 40.-Iwaki.M., Phillips.R.S., Kaufman.S., "Proteolytic modification of the amino-terminal and carboxyl-terminal regions of rat hepatic phenylalanine hydroxylase"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.216, No.5., (1986)., pp.2051-2056.
- 41.-Jolley.R.L. and Freeman.M.L., "Automated carbohydrate analysis of physiological fluids"., CLIN.CHEM., vol.14. (1968)., pp.538.
- 42.-Kaplan. L.A., Pesce .A.J., "Química clínica.", Ed.Médica panamericana, Buenos Aires Argentina., (1990)., pp.164-165.
- 43.-Kaufman Seymour., "Phenylalanine hydroxylase"., METHODS ENZYMOLOGY., vol.5., (1962)., pp.809-816.
- 44.-Kaufman Seymour., "Phenylalanine hydroxylase"., METHODS ENZYMOLOGY., vol.17., (1970)., pp.603-609.
- 45.-Kaufman. S., "Protein that stimulation rat liver Phenylalanine hydroxylase"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.245, No.18., (1970)., pp.4751-4759.
- 46.-Kaufman Seymour., "The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol.226, (1957)., pp.511-524.

- 47.-Kaufman Seymour., "The enzymatic convection of phenylalane - nine to tyrosine"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol.23., (1957)., pp.445-446.
- 48.-Kaufman Seymour., "The participation of tetrahydrofolic acid in the enzymic conversion of phenylalanine to tyro - sine"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.27. (1958)., pp.428-429.
- 49.-Kaufman Seymour., "The phenylalanine hidroxilating system frome mammalian liver"., ADVAN. ENZIMOL., vol.35, (1971). pp.245-319.
- 50.-Kaufman Seymour., "The structure of the phenylalanine hy - droxylation cofactor"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMIS - TRY., vol.50., (1963)., pp.1085-1093.
- 51.-Kaufman Seymour, Fisher B. Daniel. "Purification and some physical properties of phenylalanine hydroxylase from rat liver"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.245., - No.18., (1970)., pp.4745-4750.
- 52.-Kaufman Seymour Levenberg.B., "Further studies on the Phenylalanine-hydroxylation cofactor"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. , vol. 234. , No.10. , (1959). pp.2683-2688.
- 53.-Lacey J.D., "Hippocampal dendritic abnormalities in a - rat model of phenylketonuria"., ANNAL OF EUROLOGY., vol 16. No.5, November (1984)., pp.577-580.
- 54.-Lazarus.R.A., Wallick.D.E., Dietrich R.F., "The mechanism of phenylalanine hydroxylase"., FEDERATION PROCEEDINGS. vol.41, No.9., (1982)., pp.2605-2607.
- 55.-Lehninger Albert., "Bioquímica"., Ed.Omega., 2a.ed., Bar - celona, España., (1979)., pp.190.
- 56.-Lidsky S.A., Gutter F., Woo C.L.S., "Prenatal diagnosis of classic phenylketonuria by DNA-analysis"., THE LANCET. March 9(1985)., pp.549-551.
- 57.-Lidsky. A.S., Ledley. F.D., Dilella. A.G., "Extensive res - triction site polymorphism at the human phenylalanine hydro - xylase locus and application in prenatal diagnosis of phenyl - ketonuria"., AM.J.HUM.GENET., vol.37, (1985)., pp.619-634.

- 58.-McKean.M.C., Peterson.A.N., "Glutamine in the phenylketo -  
 neric central nervous system"., THE NEW ENGLAND JOURNAL  
 MEDICINE., vol.283., No.25., December(1970)., pp.1364-1367.
- 59.-Milstien.S.Kaufman.S., "Studies on the phenylalanine hydro-  
 xilase system in liver slices"., THE JOURNAL OF BIOLOGY  
 CHEMISTRY., vol.250., No.12., (1975)., pp.4777-4781.
- 60.-Motulsky.A.G. Yoshida.A., "Biochemical methods in red  
 cells genetics"., Ed.Academic ., New York,U.S.A., (1969).  
 pp.51.
- 61.-Murthy.L.I., Berry.H.K., "Development of phenylalanine -  
 hydroxylase activity in rat kidney"., ARCHIVES OF BIO-  
 CHEMISTRY AND BIOPHYSICS., vol.163., (1974)., pp.225-230.
- 62.-Nadler.H.L. Gerbie.A.B., "Role of amniocentesis in the  
 intrauterine detection of genetic disorders"., NEW ENGLAND  
 J. MED., vol.288., (1970)., pp.596
- 63.-Neufeld.E.F. Frantantoni.J.C., "Inborn errors of muco -  
 polysaccharide"., SCIENCE., vol.169., (1970)., pp.141.
- 64.-Paige.M.David., "Clinical nutrition"., Ed. Mosby Company  
 2a.ed., Missouri,USA., (1983)., pp.616-619.
- 65.-Parniak.M.A., Kaufman.S., "Rat liver phenylalanine hidroxi-  
 lase"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.256.  
 No.13 (1981)., pp.6876-6882.
- 66.-Pérez Tamayo Ruy "Introducción a la patología "., Ed.Medi-  
 ca panamericana., 2a.ed., Buenos Aires,Argentina., (1987).  
 pp.492-497.
- 67.-Renson.J., Weissbach.H Udenfriend.S., "Hidroxilation of  
 tryptophan by phenylalanine hydroxylase"., THE JOURNAL OF  
 BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.237., No.7.,(1962).pp.2261-2264.
- 68.-Roa.D.N., Kaufman.S., "Purification and state of activa -  
 tion of rat kidney phenylalanine "., THE JOURNAL OF BIO -  
 LOGICAL CHEMISTRY., vol.261., No.19.,(1986)., pp.8866-8876.
- 69.-Robbins.S.L., "Patología estructural y funcional".  
 Ed.Interamericana., México.,D.F., (1975)., pp.548.



- 70.-Rosebloom.F.M. Henderson.J.F., "Biochemical bases of accelerated purine biosynthesis of novoin human fibroblats lacking hypoxantine-guanine phosphorribosyl transferase". J. BIOL. CHEM., vol.243., (1968)., pp.1166.
- 71.-Rosebloom.F.M. Kelley.W.N., "Lyon hypothesis and X-Linkend disease"., LANCET., vol.2., (1967)., pp.305.
- 72.-Rotwell. V. Norman., "Understanding genetics"., Ed.Oxford University Press., 4a.ed., New York,USA., (1988). pp.77-78,86-87.
- 73.-Scott.C.D., "Analysis of urine for it is ultraviolet-absorbing constituents by high pressure anion exchange chromatography"., CLIN.CHEM., vol.14., (1968)., pp.521
- 74.-Snderman.E.S., Sansaricq.C., "Plasma and cerebrospinal fluid aminoacid concentration in phenylketonuria durin the newborn period"., THE JOURNAL OF PEDIATRICS., vol.49, No.1., July - (1981)., pp.63-67
- 75.-Strand.L.J. Felsher.B.F., "Hemobiosynthesis intermittent acute porphyria: decrease hepatic conversion of porphobilinogen to porphyrins and increased D-amino levulinic acid synthetase activity"., PROC.NAT.ACAD.SCI.vol.67., (1970). pp.1315.
- 76.-Strickberger.W.monroe., "Genetics"., Ed. Mc MillanPubli - sher., 2a.ed., New York,USA., (1978)., pp.186-187,763.
- 77.-Stryer. Lubert., "Biochemystry"., Ed. Freeman, 3a.ed., - New York,USA., (1988)., pp.18, 511-515, 517-520.
- 78.-Surensen.L.B., "Suppresion of the shun path way in primary gout by azathioprine"., PROC.NAT.ACAD.SCI., vol.55., - (1966) pp.571.
- 79.-Sutton. H. E., " $\beta$ -amino isobutyricaciduria in the metabolic basis of inherited disease"., Ed.Mac Graw Hill., New York. USA., (1960)., pp.742.
- 80.-Swaiman.F.K. Wu.R.S., "Phenylalanine and phenylacetato adverselv affect developing mammalian brain neurons" NEUROLOGY., vol.34., September (1984)., pp.1246-1250

- 81.-Thompson. J.A., Smith.I., Brenton.D., "Neurological deterioration in young adults , with phenylketonuria" THE - LANCET., vol.336., (1990)., pp.602-605.
- 82.-Thompson.J.S. Thompson.M.W., "Genética Medica ", Ed.Salvat., 2a ed., Barcelona, España., (1975)., pp.85, 107-117, 342-343.
- 83.-Tsai.F.T., Hsiao.J.K., "Phenylketonuria mutation in chinese haplotype 4 identical with haplotype 2 mutation in northern - european caucasians"., HUMAN GENETICS., vol.84., - (1990)., pp.409-411.
- 84.-Tyfield.L.A., Meredith.A.L., Osborn.H.D., "Genetic analysis of treated and untreated phenylketonuria in one family ". J.MED.GENET., vol.27., (1990)., pp.564-568.
- 85.-Udenfriend.Sidney Cooper.R., "The chemical stimulation of tyrosine and tyramine"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.196., (1952)., pp.227-233.
- 86.-Udenfriend.Sidney Cooper.R., "The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine"., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.194., (1952)., pp.503-511.
- 87.-Valenti.C. Schutta.E.J., "Citogenetic in utero diagnosis of mongolism"., J.A.M.A., vol.207., (1979)., pp.1513.
- 88.-Vorhees.V.C. Berry.K.H., "Branched chain aminoacids improve complex maze learning in rat offspring prenatally exposed to hyperphenylalaninemia: Implications for maternal phenylketonuria"., PEDIATRICS RESEARCH., vol.25., No.6. (1989) pp.568-572.
- 89.-Wang T., Okano.Y., Eisensmith.R., "Molecular genetics of - phenylketonuria in orientals: Linkage disequilibrium between a termination mutation and haplotype 4 of the phenylalanine hydroxylase gene"., AM. J. HUM. GENET., vol.45., (1989). pp.675-680.
- 90.-Weber.K., Osborn.H., "The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis"., THE JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.244 No.16., (1969)., pp.4406-4412.

- 91.-Winchester.A.N., "Genética"., Ed.Continental., México.,D.F.  
(1984)., pp.17, 98, 382-384, 389..
- 92.-Woo.C.L.S., "Collation of R.F.L.P. haplotypes at the human  
phenylalanine hidroxilase(P.A.H.)Locus"., AM. J. HUMAN. GENT.  
vol.43., (1989)., pp.781-783.
- 93.-Wong.W.K., O'flynn.M.E. Inouye.T., "Fluorometric determi -  
nation clinical of aminoacid phenylalanine"., CLINICAL CHE -  
MISTRY., vol.10., (1964)., pp.1098.
- 94.-Woods. A.R., "Biochemical Genetics"., Ed.Chapman Hill., -  
New York,USA., (1973)., pp.11-12.

## G L O S A R I O

- ARNm : Acido Ribonucleico mensajero.
- ADN : Acido Desoxirribonucleico.
- G : Base nitrogenada Guanina.
- T : Base nitrogenada Timina.
- A : Base nitrogenada Adenina.
- C : Base nitrogenada Citosina.
- O<sub>2</sub> : Molécula de Oxígeno.
- H<sub>2</sub>O : Molécula de Agua.
- THB : Cofactor Tetrahidrobiopterina.
- DHB : Cofactor Dihidrobiopterina.
- NADPH : Coenzima Nicotin Adenin Difosfato(Estado reducido).
- NADP<sup>+</sup> : Coenzima Nicotin Adenin Difosfato(Estado oxidado).
- CO<sub>2</sub> : Molecula de Dioxido de Carbono.
- NADH : Coenzima Nicotin Adenin Dinucleótido(Estado oxidado).
- NAD : Coenzima Nicotin Adenin Dinucleótido(Estado reducido).
- PKU : Siglas en ingles de Fenilketonuria(Phenylketonuria).
- S.N.C. : Sistema Nervioso Central.
- DOPA : Dihidroxifenilalanina.
- ATP : Adenosin Trifosfato.
- AMPc : Adenosin Monofosfato ciclico.
- [ ] : Notación de concentración.
- T<sup>o</sup> : Temperatura.
- 1/v : Inverso de la velocidad.
- 1/s : Inverso de la concentración de sustrato.