

00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES  
FACULTAD DE QUIMICA

5 leg.



**GENETICA HUMANA MOLECULAR**

**ESTUDIOS EN TORNO A UN PACIENTE CON  
ENFERMEDAD DE ORINA DE JARABE DE  
ARCE Y A SUS PADRES.**

**EJEMPLAR UNICO**

**FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS**

**BIOQUIMICA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

2002



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 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.
CAPITULO I	
LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO	1
CAPITULO II	
LA ENFERMEDAD DE ORINA DE JARABE DE ARCE	31
<u>Introducción</u>	31
<u>Aspectos Hereditarios</u>	33
<u>El Error Metabólico</u>	34
<u>Patología</u>	34
<u>Metabolismo de los Aminoácidos de Cadena Ramificada</u>	42
Transaminación	43
Decarboxilación oxidativa	46
<u>Deshidrogenasa de Cetoácidos de Cadena Ramificada</u>	53
Localización tisular, celular y purificación	53
Interacciones metabólicas	61
<u>Variantes de la Enfermedad</u>	67
<u>Diagnóstico</u>	75
<u>Tratamiento</u>	76
CAPITULO III	
MATERIAL Y METODOS	80
Estudios Diagnósticos	
Cromatografía bidimensional ascendente para amino- ácidos urinarios.	80

	Pág.
Cromatografía unidimensional descendente para aminoácidos plasmáticos	82
Cromatografía en capa fina para dinitrofenilhidrazonas en orina	83
Prueba cualitativa de dinitrofenilhidrazina - para compuestos ceto	84
Determinación de aminoácidos plasmáticos por cromatografía automatizada de intercambio iónico	85
Cuantificación de leucina por el método de -- inhibición microbiológica de Guthrie	85
<u>Cultivo de Tejidos</u>	89
<u>Estudios de Enzimología</u>	
Determinación de proteínas por el método de - Lowry, modificado	95
Preparación del ácido alfa-ceto-isovalérico-1- <sup>14</sup> C	96
Medición de la deshidrogenasa de cetoácidos - de cadena ramificada en células intactas	98
Medición de la deshidrogenasa de cetoácidos - de cadena ramificada en homogenados celulares	101
CAPITULO IV	
RESULTADOS	105
CAPITULO V	
DISCUSION	124
CAPITULO VI	
CONCLUSION	137
REFERENCIAS	140

## INTRODUCCION

Es difícil hacer ciencia en México. Me refiero, -- claro está, a la ciencia de calidad que puede considerarse como una contribución original al conocimiento universal y no -- una mera repetición o estudio colateral de algún problema fundamental cuya resolución se inició en el extranjero. Sin embargo, es precisamente de este último tipo de estudios del que se nutre gran parte de la ciencia mexicana. Es innegable que -- las cosas han cambiado mucho en los últimos 20 años y que en la actualidad existen varios sitios en el país con una evidente -- excelencia académica apoyada por una cada vez más efectiva infraestructura. A este respecto, hace tiempo el Dr. Soberón me replicaba que si ahora es difícil hacer ciencia y, sobre todo, hacerse científico, hace apenas unos años era heroico.

De cualquier manera, no deja de ser irónico y doloroso que, como lo ha hecho notar Mario Castañeda, México no -- posee todavía una tradición científica ni "...una sola escuela que forme, de primera intención, investigadores en bioquímica" (1), a pesar de poseer la Universidad más antigua del continente. Muchos podrían afirmar que no es la tradición propiamente, sino el apoyo económico y la infraestructura lo que permite mantenerse dentro de los ámbitos altamente competitivos

(1) Castañeda, Mario: "Recapitulación", en "Antología de Biología Molecular", editado por Castañeda, Mario; Universidad Nacional Autónoma de México, p. 243, 1973.

de la investigación biológica contemporánea y generar contribuciones originales. Aunque es absurdo menospreciar el papel jugado por la infraestructura, igualmente absurdo es sobrevalorarla. La historia de la ciencia nos muestra continuamente que aún en nuestros días muchos grandes descubrimientos fueron producto fundamentalmente de un cuidadoso análisis epistemológico del problema apoyado por una metodología similar a la que se contaba, por ejemplo, en un país pobre como México.

El presente trabajo, gestado dentro de ese ámbito todavía falto de tradición, dista mucho de ser una contribución importante; menos aún, original, dentro del campo de la biología. Posee, sin embargo, a pesar de sus muy modestos --logros, el mérito innegable de haber iniciado a su autor, de una manera formal, dentro del quehacer científico. Aunque hubiera deseado que los objetivos definidos al principio de la investigación hubieran podido ser alcanzados, no puedo dejar de reconocer y, consecuentemente, agradecer, que a pesar de las limitaciones finales el objetivo fundamental se alcanzó: mi iniciación dentro del método científico.

A lo largo de la realización del mismo intervinieron varias personas a las que sinceramente agradezco su orientación, consejos y apoyo. El mencionar a cada una de ellas me obligaría a elaborar una lista demasiado larga. Sin embargo,

no puedo dejar de hacer patente mi agradecimiento al Dr. Antonio Velázquez por la dirección del proyecto, así como a las Doctoras Alessandra Carnevale y Victoria del Castillo y a -- Emma Prieto, Ma. Luisa Villarreal, Jorge Verduzco, Elba Már-- quez y Carmelo López por toda su colaboración. De manera muy - especial, le agradezco a Rocío las múltiples tardes compartidas al ayudarme en la realización de los experimentos y su -- constante y decisiva estimulación para que este trabajo se es cribiera.

Deseo agradecer también al Dr. Emilio Rosenblueth y a su gentil esposa, Sra. Alicia T. de Rosenblueth el generoso apoyo que me brindaron para que los resultados reportados en el presente trabajo pudieran ser presentados en el XIV Congreso Internacional de Genética realizado en Moscú, U.R.S.S., en 1978.

Agradezco también la comprensión, el entusiasmo y - el apoyo que continuamente me ofreciera Magalí.

Finalmente, agradezco de manera muy especial el apo yo incondicional y gratuito que siempre me han entregado mis más cercanos colaboradores: mis padres y mi hermano Oscar, a quiénes dedico este trabajo.

## CAPITULO I

### LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

La individualidad de los organismos es un fenómeno complejo cuyo análisis con frecuencia es subvalorado y aún -- ignorado. En el caso de la especie humana, a nadie sorprende que en una población de más de 6000 millones de individuos, no se encuentren nunca 2 seres con rasgos faciales idénticos salvo, claro está, en el caso de gemelos monocigóticos. Por el -- contrario, lo sorprendente sería encontrar a 2 individuos que, no siendo gemelos, fueran idénticos.

Sin embargo, la claridad con la que el hombre distingue su propia individualidad a nivel anatómico-facial práctica-- mente desaparece al considerarla desde una perspectiva molecu-- lar. Ello no deja de ser paradójico ya que en el último anális esa individualidad anatómico-facial no es más que la expre-- sión final de su individualidad molecular, modulada por el me-- dio ambiente en el que se desarrolla. La importancia de este tipo de consideración va más allá de un valor puramente acadé-- mico ya que muchas manifestaciones de diversidad anatómica, -- fisiológica, patológica y aún psicológica y sociológica solo -- podrán llegar a ser apreciadas de una manera más lógica e integral en la medida en que nuestros conocimientos sobre la diversidad molecular de los organismos en general y del Hombre en -

particular sean más completos. Este tipo de estudios nos permitirá llegar, finalmente, a una imagen cada vez más rica y completa de la especiación y evolución de los organismos.

Consecuentemente, si se acepta que la variación individual, la salud y la enfermedad están controladas por mecanismos genéticos en contínua interacción con el medio ambiente, no debería de sorprender la extraordinaria gama de diversidad individual existente en la especie humana. Esta enorme variabilidad puede ilustrarse de una manera dramática al considerar que la heterocigocidad promedio por locus calculada para la especie humana es de un 6.7% (Dobzhansky, et al., -- 1977; Harris y Hopkinson, 1972). Si el número haploide de -- genes estructurales en una célula humana es de aproximadamen-- te 100,000, entonces un ser humano será, en promedio, hetero-- cigoto para unos 6,700 loci. En función de las combinaciones posibles entre dichos loci, ese individuo podría, potencial-- mente, producir unas  $2^{6700}$  células germinales diferentes o -- bien, expresado en base 10,  $10^{2017}$  células germinales. ¡El -- número total aproximado de átomos en el universo es de solo --  $10^{80}$ !

La mejor apreciación de este fenómeno ha sido posi-- ble gracias a las contribuciones de diferentes modelos experi-- mentales de la genética y bioquímica humana. Sin embargo, no es aventurado considerar que algunas de las contribuciones --

más importantes han surgido del estudio de los errores innatos del metabolismo, los cuales pueden definirse como alteraciones bioquímicas genéticamente determinadas debidas a defectos congénitos específicos en la estructura o funcionamiento de moléculas proteicas (Rosenberg, 1980). El término fue acuñado a principios del siglo por Sir Archibald Garrod para describir algunas alteraciones metabólicas humanas estudiadas por él tales como la alcaptonuria, el albinismo, cistinuria y pentosuria. En sus Croonian Lectures en 1908, llegó incluso a definir las características genéticas y bioquímicas más sobresalientes de este tipo de problemas, 50 años antes de que pudiera obtenerse una corroboración bioquímica (LaDu, et al., 1958). En dichas conferencias mencionó que: "El concepto de metabolismo en bloque está cediendo su lugar al de metabolismo en compartimientos. Día con día gana terreno la idea de que cada paso sucesivo en la síntesis y degradación... de fracciones individuales de proteínas y azúcares individuales es el trabajo de enzimas especializadas adaptadas para cada propósito particular. Bien podría ser que los productos intermedios formados en las varias etapas tuvieran solo una existencia momentánea como tales, estando sujetos a un cambio posterior, de la misma manera que cuando se detiene una película cinematográfica y las figuras en movimiento quedan con un pié en el aire. Todo lo que se sabe del curso del catabolismo tiende a mostrar que en tales circunstancias el producto intermediario será excretado como tal, mas que ser procesa

do a lo largo de líneas anormales" (Garrod, 1908).

Los conceptos básicos sobre la patogenia de este -- tipo de alteraciones pudieron ser enunciados al estudiar Garrod una alteración metabólica conocida como alcaptonuria. Esta - alteración se caracteriza por la excreción urinaria de grandes cantidades de ácido homogentísico (alcaptona), el cual normalmente no se encuentra en la orina. Durante los primeros minutos posteriores a la micción la orina tiene un aspecto normal pero rápidamente se torna negra debido a la oxidación del ácido homogentísico. Excepto por el hecho de que los individuos afectados por esta alteración pueden llegar a desarrollar en la edad adulta un tipo de artritis conocida como ocronosis, - no presentan ninguna otra manifestación y son por lo demás -- sanos.

Aunque nunca antes se había encontrado ácido homo-- gentísico en algún tejido de individuos normales, Garrod ob-- servó que cuando se administraba oralmente a sujetos alcapto-- núricos, éstos lo excretaban en cantidades todavía mayores -- por orina; mientras que si se le daba a individuos normales, dicha sustancia no aparecía en la orina. Por otra parte, -- cuando a individuos alcaptonúricos se les daba una dieta rica en proteínas, la excreción del ácido también aumentaba. Pudo determinar que dos aminoácidos, fenilalanina y tirosina, al ser administrados en forma pura, provocaron la excreción au--

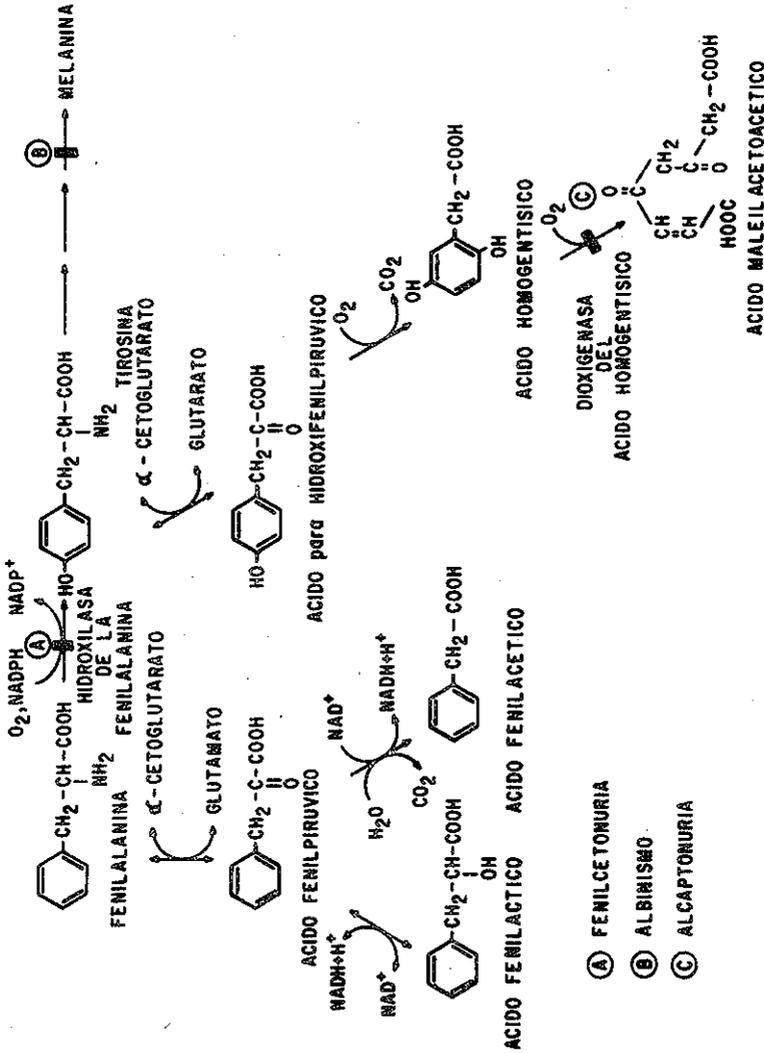
mentada de ácido homogentísico. Nuevamente, individuos normales con dieta rica en proteínas o con la administración de los aminoácidos aromáticos puros no mostraron ninguna excreción de dicho ácido.

Este tipo de experimentos metabólicos permitieron a Garrod inferir que si bien no era posible encontrar ácido homogentísico en líquidos fisiológicos ni en tejidos de sujetos normales, dicho ácido debería de ser un intermediario normal en el catabolismo de fenilalanina y tirosina y que su acumulación en individuos alcaptonúricos debería ocurrir por una deficiencia en la degradación del mismo por la falta de alguna actividad enzimática. Debieron de pasar más de 50 años para que la oxidasa del ácido homogentísico (la cual cataliza la conversión del ácido homogentísico a maleilacetoacético) fuera identificada como la responsable de la alcaptonuria (Figura 1).

Por otra parte, Garrod observó también que esta alteración metabólica, aunque de baja frecuencia, tenía una marcada distribución familiar la cual podía ser explicada en los términos de las recién redescubiertas leyes de Mendel según los análisis realizados por William Bateson. Dicha distribución correspondía al de un factor mendeliano recesivo. Este fue el primer caso en la historia de la genética en que se describió la herencia recesiva en el ser humano. Por lo tan-

FIG. 1

ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO  
- ALGUNOS DEFECTOS ENZIMATICOS -



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

to, Garrod interpretó a la alcaptonuria como una alteración -- causada por una deficiencia congénita de una enzima en particular debida a la presencia en dosis doble de un factor -gen-mendeliano anormal. Una implicación importante de esta idea fue la de que de alguna manera el alelo normal de dicho gen es necesario para la formación de la enzima en un organismo normal. Es sumamente interesante señalar en este punto que esta fue la primera vez que los biólogos contaron con evidencia sugestiva de que los genes ejercen su efecto en el organismo dirigiendo la síntesis de enzimas y otras proteínas.

Sin embargo, la extraordinaria trascendencia de estas observaciones surgidas del estudio de la genética humana -- pasaron totalmente desapercibidas a la comunidad científica de la época. Años más tarde, al reflexionar sobre este hecho, -- George Beadle escribió: ¿Porqué el trabajo de Garrod no fue -- apreciado y así, olvidado? Fue bien conocido a Bateson y se -- refirió a él en su libro Mendel's Principles of Heredity de -- 1909. La edición de 1920 del libro de texto Genetics and --- Eugenics de W. E. Castle, cita el artículo de Garrod de 1902 -- sobre alcaptonuria en la bibliografía, pero no se refiere a él en el texto. Después, desapareció de todos los libros estándar de genética hasta que en 1942 J. B. S. Haldane en su -- New Paths in Genetics discutió la alcaptonuria en el contexto del metabolismo de fenilalanina y tirosina y de su control genético... Me parece que, como Mendel, Garrod estuvo tan ade--

lante de su tiempo, que los bioquímicos y genetistas no estaban listos para contemplar seriamente su concepto reacción-enzima-gene. Como el trabajo de Mendel, el de Garrod permaneció para ser redescubierto independientemente a un tiempo más favorable en el desarrollo de las ciencias biológicas. Sospecho que un componente común e importante de un clima no receptivo, en estos dos ejemplos, es el sentimiento persistente de que cualquier concepto simple en la biología debe estar equivocado" (Beadle, 1966).

De la misma manera, en 1958, al recibir el premio -- Nobel, Beadle se refirió al trabajo de Garrod en los siguientes términos: "De esta manera larga e indirecta, primero en Drosophila y luego en Neurospora, hemos redescubierto lo que tan claramente visualizó Garrod hace tantos años. Ahora conocemos su trabajo y estamos concientes de que en principio hemos contribuido muy poco, si es que lo hemos hecho. Trabajamos con un organismo más favorable y fuimos capaces de producir, casi a voluntad, errores innatos del metabolismo para casi -- cualquier reacción química cuyo producto pudiéramos suplementar a través del medio. Consecuentemente, fuimos capaces de demostrar que lo que Garrod observó para algunos genes y unas cuantas reacciones químicas en el hombre es válido para muchos genes y muchas reacciones en Neurospora" (Beadle, 1959).

El estudio de este tipo de alteraciones por parte del biólogo molecular ha trascendido las solas implicaciones clíni-

cas. Actualmente, son cada vez más los especialistas que -- reconocen la importancia de los errores innatos del metabolismo como modelo experimental para el estudio de la biología molecular del hombre. Aunque sería absurdo negar las decisivas contribuciones derivadas del empleo de modelos bacterianos y de eucariotes sencillos, tampoco deja de ser cierta la aseveración de Pope: "El estudio más apropiado para la humanidad es el estudio del hombre mismo".

Muchas de las vías y mecanismos metabólicos norma-- les en el hombre han podido ser definidos mediante el estudio de este tipo de errores metabólicos. Así por ejemplo, el estudio de los defectos enzimáticos en la fenilcetonuria, albinismo y alcaptonuria permitió obtener información fundamental acerca de las vías metabólicas de los aminoácidos aromáticos. Buena parte de nuestros conocimientos actuales sobre el metabolismo de los carbohidratos ha derivado de investigaciones -- sobre galactosemia, pentosuria y las glucogenosis. De la misma manera, muchos aspectos de las vías metabólicas de las purinas y de las pirimidinas han sido estudiados gracias a alteraciones como la gota, el síndrome de Lesch-Nyhan, la acidu--ría orótica hereditaria, etc. Por otra parte, se ha podido -- llegar a dilucidar importantes conceptos genéticos a través -- del estudio de este tipo de alteraciones. Uno de estos con--ceptos lo constituye, sin duda alguna, el hecho de que las serias consecuencias, frecuentemente letales de estas alteracioo

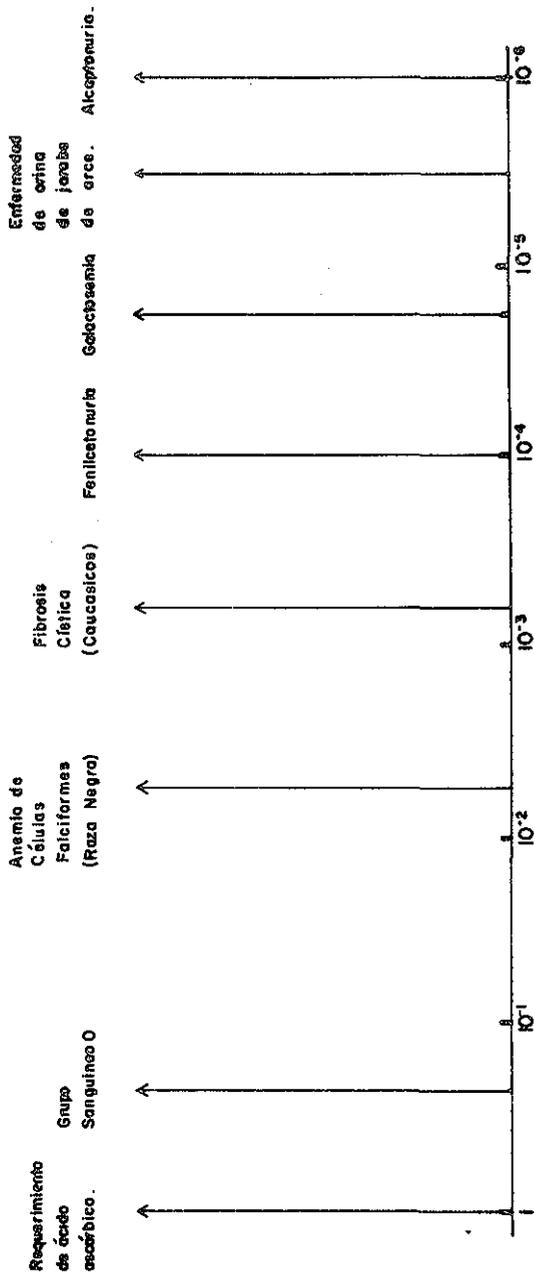
nes, pertenecen realmente a una continuidad de eventos mutacionales (Figura 2). En uno de los extremos de esta continuidad de eventos se encontrarían aquellas mutaciones extraordinariamente raras que darían origen a alteraciones como la galactosemia y la enfermedad de orina de jarabe de arce. Estas mutaciones son, consecuentemente, responsables de graves anomalías clínicas y bioquímicas. En el otro extremo se encuentran las mutaciones de frecuencias muy elevadas que condicionan genotipos responsables de manifestaciones tales como los antígenos de superficie de los glóbulos rojos (grupos sanguíneos), la especificidad de la estructura de anticuerpos o los requerimientos de ácido ascórbico (Rosenberg, 1980). Como Harris ha señalado, los individuos con sangre tipo O pueden ser considerados como afectados por un error innato del metabolismo resultante de un defecto en la enzima generadora de los antígenos de superficie A o B (Harris, 1967). Sin embargo, este error "afecta" a cerca del 50% de la población mundial y, excepto en los accidentes por transfusión, no causa ninguna patología demostrable. De igual manera, todos los seres humanos carecen de la enzima que convierte a la L-gulonolactona en ácido ascórbico aunque esta carencia no tiene ninguna consecuencia clínica o bioquímica mientras se ingiera suficiente ácido ascórbico.

Es posible ampliar todavía más este concepto de continuidad en la incidencia de mutaciones. En los últimos años

FIG:2

# INCIDENCIA DE FENOTIPOS MUTANTES EN LA POBLACION

Continuidad de los Eventos Mutacionales en el Hombre



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

se han reconocido con mayor frecuencia fenotipos clínicos o bioquímicos específicos producidos por diferentes genotipos, fenómeno denominado heterogeneidad genética. Ello no es más que la expresión de una continuidad en la incidencia de mutaciones a nivel de un solo locus. Para ilustrar dicho fenómeno considérese el caso de la cadena beta de la hemoglobina humana para la cual se han descrito más de 100 casos diferentes de mutaciones puntuales. En muchos de esos casos, las manifestaciones clínicas -fenotipos- fueron similares a pesar de haber sido condicionadas por distintos genotipos.

Para el caso de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se han reportado dos variantes debidas a sustituciones únicas de aminoácidos diferentes (Kirkman, 1971; Yoshida, 1970) pero con manifestaciones clínicas similares consistentes en una predisposición a la anemia hemolítica.

La heterogeneidad genética puede ser el resultado de mutaciones alélicas o no alélicas. En el primer caso, el fenotipo común es la consecuencia de más de una mutación en un locus (alelo) mientras que en el segundo caso es debido a mutaciones en loci diferentes. Las mutaciones alélicas pueden, a su vez, ser subdivididas en homoalélicas cuando en una cadena polipeptídica ocurren en el mismo sitio sustituciones de diferentes residuos de aminoácidos y en heteroalélicas en las que las sustituciones de diferentes residuos de aminoácidos ocurren en diferentes sitios del polipéptido.

Independientemente de cual sea el tipo de mutación producida, las consecuencias de dicha mutación se reflejarán primariamente en la actividad de la proteína para la cual codifica el gene afectado. Actualmente se sabe que la mayoría de los errores innatos del metabolismo son heredados clínicamente de manera autosómica recesiva. De hecho, son relativamente poco frecuentes aquellos errores heredados de manera dominante. Una razonable explicación a este fenómeno es la de que la mayoría de las enzimas se encuentran presentes en exceso con respecto a la actividad realmente necesitada por la célula en las circunstancias ambientales usuales. LaDu y sus asociados calcularon que, bajo condiciones óptimas, la oxidasa del ácido homogentísico podría metabolizar más de 200 veces la cantidad habitualmente existente del ácido en la célula (LaDu, et. al., 1958). Una reducción a la mitad de esta actividad en un individuo heterocigoto para el gene de la oxidasa no llega a producir, por lo tanto, un bloqueo significativo en la vía metabólica de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, de los cuales deriva el ácido homogentísico, ni tampoco un cuadro clínico evidente. Situaciones similares deben de existir para la gran mayoría de los errores innatos del metabolismo, los cuales son diagnosticables clínicamente solo cuando el individuo es heterocigoto para el gen mutante.

En el caso de aquellos errores heredados de manera dominante es necesario invocar que las enzimas responsables -

de la manifestación de tales alteraciones deben de ser sintetizadas en tal cantidad que una reducción a aproximadamente la mitad de la actividad normal sería limitante y conduciría a un semibloqueo de la vía metabólica. Un ejemplo lo constituye la hipercolesterolemia familiar, enfermedad en la que la cantidad de receptores funcionales para el complejo colesterol-lipoproteína de baja densidad en la superficie celular, no es suficiente ni siquiera en los heterocigotos (Brown, -- 1976).

Consideradas desde otra perspectiva, las alteraciones bioquímicas más frecuentemente observadas en los errores innatos del metabolismo son, en términos generales, aquellas debidas a deficiencias de algún precursor, acumulación del precursor, utilización aumentada de vías alternas o una alteración en el control de retroalimentación de la vía metabólica afectada. De cada uno de estos tipos de alteraciones teóricas se cuenta con ejemplos concretos. Así, en la enfermedad de Hartnup, caracterizada por ataxia cerebelosa y demencia -- temporal o permanente, los pacientes afectados no sintetizan cantidades suficientes de nicotinamida por falta de triptofano ya que el sistema de transporte intestinal para este metabolito se encuentra alterado. De esta manera, una falla en el transporte metabólico condiciona la deficiencia del precursor.

En el caso de la galactosemia, la falta de activi--

dad de la galactosa-1-fosfato uridil transferasa es la responsable de que se acumulen grandes cantidades de galactosa con las consecuentes manifestaciones clínicas.

La fenilcetonuria ilustra claramente cómo una alteración enzimática (fenilalanina hidroxilasa) obliga al metabolito a continuar por una vía metabólica colateral (Figura 1), ocasionando de esta manera la elevación de otras sustancias propias de dicha vía colateral. En este caso son los ácidos fenilacético, feniláctico y fenilpirúvico los que se encuentran elevados además de la fenilalanina.

Un error innato del metabolismo ocasionado por una deficiencia de producto puede ejemplificarse con el cretinismo debido a una deficiente síntesis de la hormona tiroidea. Esta deficiencia en la síntesis puede deberse a una falla en cualquiera de las enzimas que participan en la biosíntesis de la triyodotironina y la tiroxina a partir del aminoácido tirosina.

Finalmente, en algunos casos de gota primaria, enfermedad en la que hay una considerable elevación de ácido úrico, dicha elevación parecería deberse a una incapacidad de las primeras enzimas alostéricas de la vía de biosíntesis de las purinas de obedecer las señales de los moduladores negativos hipoxantina y adenina, con la resultante producción elevada de ácido úrico.

Durante muchos años el descubrimiento de este tipo de errores estuvo prácticamente limitado al análisis cualitativo y cuantitativo de sangre y orina. Sin embargo, durante los últimos 25 años nuevas y más poderosas técnicas bioquímicas han permitido descubrir una enorme cantidad de errores metabólicos. Dentro de estas técnicas destacan el análisis bioquímico y enzimático de muestras de diversos tejidos (hígado, riñón, músculo, bazo, cerebro, eritrocitos, leucocitos, etc.) y el uso de células en cultivo. La utilización de esta última técnica en especial ha brindado a la genética humana enormes posibilidades de avance al reducir la complejidad de un ser humano completo a un nivel unicelular sin afectar su esencia eucariótica (Carrel, 1912; Eagle, 1955; Eagle, 1959; Krooth, 1961; Puck, et. al., 1957). Gracias a ello ha sido posible llegar incluso al diagnóstico prenatal de varios de estos padecimientos mediante el análisis bioquímico del líquido amniótico y el cultivo y posterior estudio de las células de descamación presentes en dicho líquido.

Mediante el uso combinado de esta metodología se han descubierto errores metabólicos que afectan el metabolismo de moléculas pertenecientes a cualquiera de las cuatro grandes familias, a saber: carbohidratos, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos. Además de estos errores se han descrito muchos otros que afectan el transporte de moléculas -- así como otros que por sus variadas características no pueden agruparse en ninguno de los grupos mencionados. En la Tabla

1 están listados algunos de los errores innatos del transporte molecular; la Tabla 2 lista los errores más importantes - debidos a deficiencias enzimáticas específicas y la Tabla 3 agrupa a otros errores misceláneos.

TABLA 1

## ERRORES HEREDITARIOS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA

Alteración	Sustancia involucrada
Acidosis renal tubular I	bicarbonato
Acidosis renal tubular II	hidrogenión
Aminoaciduria dibásica	lisina, arginina, ornitina
Anemia perniciosa (juvenil)	vitamina B <sub>12</sub>
Cistinuria I, II, III	cistina, lisina, arginina, ornitina
Cretinismo bocioso	iodo
Enfermedad de Hartnup	aminoácidos monoamino-monocarboxílicos
Esferocitosis hereditaria	sodio, agua
Glicosuria renal	glucosa
Hipercistinuria	cistina
Iminoglicinuria	iminoácidos, glicina
Raquitismo hipofosfatémico	fósforo, calcio

Modificado de Rosenberg, 1980.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2

ALGUNOS ERRORES HEREDITARIOS DEBIDOS A DEFICIENCIAS  
DE ENZIMAS ESPECIFICAS

Alteraciones del Metabolismo de Carbohidratos

Alteración	Enzima
Anemia hemolítica I	hexocinasa
Anemia hemolítica II	fosfohexosa insome-- rasa
Anemia hemolítica V	piruvato cinasa
Anemia hemolítica VI	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Deficiencia de galactocinasa	galactocinasa
Enfermedad de atesoramiento de glucógeno I (Von Gierke)	glucosa-6-fosfatasa
Enfermedad de atesoramiento de glucógeno II (Pompe)	alfa-1,4-glucocinasa
Enfermedad de atesoramiento de glucógeno V (McArdle)	fosforilasa (músculo)
Enfermedad de atesoramiento de glucógeno VI	fosforilasa (hígado)
Fructosuria	fructocinasa (hígado)
Galactosemia	galactosa-1-fosfato uridil transferasa
Intolerancia a disacáridos I	invertasa
Intolerancia a disacáridos II	invertasa, maltasa
Intolerancia a disacáridos III	lactasa
Intolerancia a la fructosa	fructosa-1-fosfato aldolasa
Pentosuria	L-xilulosa reductasa

20

TABLA 2  
(continúa)

Alteraciones del Metabolismo de Lípidos

Alteración	Enzima
Deficiencia de lipasa	lipasa (pancreática)
Enfermedad de Fabry	ceramido trihexosidasa
Enfermedad de Gaucher	glucocerebrosidasa
Enfermedad de Niemann-Pick	esfingomielinasa
Enfermedad de Woman	lipasa ácida
Gangliosidosis G <sub>M1</sub> (I y II)	beta-galactocidasa
Gangliosidosis G <sub>M2</sub> (ay-Sachs)	hexosaminidasa A
Gangliosidosis G <sub>M2</sub> (Sandhoff)	hexosaminidasa A y B
Leucodistrofia metacromática	arilsulfatasa A

TABLA 2  
(continúa)

Alteraciones del Metabolismo de Aminoácidos

Alteración	Enzima
Acidemia isovalérica	isovaleril-CoA des- hidrogenasa
Aciduria arginosuccínica	argininosuccinato - liasa
Aciduria metilmalónica	metilmalonil-CoA -- mutasa
Albinismo	tirosinasa
Alcaptonuria	oxidasa del ácido - homogentísico
Argininemia	arginasa
Citrulinemia	argininosuccinato - sintetasa
Cretinismo bocioso	iodotirosín dehalo- genasa
Enfermedad de orina de jarabe de arce	deshidrogenasa de - cetoácidos de ca dena ramificada
Fenilcetonuria	fenilalanina hidro- xilasa
Hidroxiprolinemia	hidroxiprolina oxi- dasa
Hiperamonemia	ornitín transcarba- milasa
Hiperoxaluria I	alfa-cetoglutarato: gli-oxilato car- boligasa
Hiperoxaluria II	glicerato deshidro- genasa
Hiperprolinemia I	prolin oxidasa
Hiperprolinemia II	pirrolín carbocila- to deshidrogenasa
Histidinemia	histidasa
Homocistinuria	cistationín sintete sa
Tirosinemia I	p-hidroxfenilpiru-- vato oxidasa
Tirosinemia II	Tirosina transamina- sa
Valinemia	valina transaminasa

TABLA 2  
(continúa)

Alteraciones del Metabolismo de Acidos Nucleicos

Alteración	Enzima
Aciduria orótica I	orotidilato fosforilasa y orotidilato de carboxilasa
Aciduria orótica II	orotidilato decarboxilasa
Anemia hemolítica XI	adenosín trifosfatasa
Anemia hemolítica XII	adenilato cinasa
Gota primaria (una forma)	hipoxantin-guanin-fosforibosil transfe-- rasa
Xeroderma pigmentoso	endonucleasa

TABLA 3

ALGUNOS ERRORES HEREDITARIOS DEBIDOS A DEFICIENCIAS  
DE ENZIMAS ESPECIFICAS

Alteraciones Misceláneas

Alteración	Enzima
Acatalasia	catalsa
Deficiencia de fosfatasa ácida	fosfatasa ácida
Deficiencia de tripsinógeno	tripsinógeno
Enfisema pulmonar	alfa-1-antitripsina
Hiperplasia adrenal I	21-hidroxilasa
Hiperplasia adrenal II	11-hidroxilasa
Hiperplasia adrenal III	3-beta-hidroxieste-- roide deshidrogenasa
Hiperplasia adrenal IV	17-hidroxilasa
Hipofosfatasa	fosfatasa alcalina
Mucopolisacáridosis I	alfa-L-iduronidasa
Porfiria aguda intermitente	uroporfirinógeno I -- sintetasa
Porfiria congénita eritropoyé- tica	uroporfirinógeno III cosinetasa
Síndrome de Crigler-Najjar	glucuronil-transferasa

Seguramente que pocos aspectos de la fisiología humana pueden llegar a ser tan fascinantes para el biólogo como el de las llamadas funciones superiores del sistema nervioso central; a saber, la memoria, el aprendizaje y la conciencia. Aunque todavía está muy lejos el día en el que se llegue a -- contar con explicaciones fundamentales para estos fenómenos, la biología molecular comienza ya a realizar los primeros intentos encaminados a la solución del problema. Pudiera ser -- que los errores innatos del metabolismo también contribuyan -- en el futuro con modelos experimentales apropiados para este tipo de investigaciones.

La expresión lógica y racional de fenómenos como la memoria y la conciencia dependen fundamentalmente del correcto funcionamiento del cerebro. Pero, a su vez, el funcionamiento del cerebro y del resto del tejido nervioso es dependiente de las reacciones químicas ocurridas en la célula nerviosa. De hecho, el cerebro y el sistema nervioso son más -- sensiblemente dependientes a la velocidad de las reacciones -- químicas que ningún otro órgano. Por ello, investigadores -- como Linus Pauling creen que muchas de las enfermedades mentales son causadas por velocidades de reacción anormales determinadas por la constitución genética y la dieta así como por las concentraciones moleculares de sustancias esenciales --- (Pauling, 1968). En varios casos, se ha podido mejorar la -- salud mental de muchas personas simplemente asegurando la óptima concentración de sustancias normalmente presentes en el

cuerpo humano. Un ejemplo importante de una molécula esencial para la salud mental es el de la cianocobalamina o vitamina B 12. Una deficiencia de esta vitamina, cualquiera que sea su causa, conduce a alteraciones mentales frecuentemente más pronunciadas que las demás consecuencias clínicas. En muchos casos, las alteraciones mentales asociadas a la anemia perniciosa fueron observadas varios años antes de la aparición de cualquier otra manifestación clínica (Wiener y Hope, 1959).

En 1941, Sydenstricker y Cleckley reportaron un exitoso tratamiento de 29 pacientes con síntomas siquiátricos severos mediante el uso de grandes dosis de ácido nicotínico (0.3 - 1.5 g/día) a pesar de que ningún paciente presentaba un cuadro clínico de pelagra ni de ninguna otra avitaminosis (Sydenstricker y Cleckley, 1941). Por ello, desde 1952 Hoffer y Osmond usan ácido nicotínico en grandes dosis, además de la terapia convencional, para el tratamiento de la esquizofrenia (Hoffer y Osmond, 1964).

Otra vitamina que ha sido usada con cierta frecuencia en el tratamiento de enfermedades mentales es el ácido ascórbico. Además de que el escorbuto se acompaña de síntomas mentales, Akerfeldt reportó en 1957 que el suero de esquizofrénicos mostraba una mayor capacidad de oxidación de N,N-dimetil-p-fenilendiamina que el de otras personas. Pos-

teriormente se observó que esta diferencia es debida a una menor concentración de ácido ascórbico en el suero de los pacientes esquizofrénicos. Esta diferencia ha sido atribuida a los malos hábitos dietéticos de estos pacientes pero también a una velocidad aumentada del metabolismo del ácido ascórbico por el paciente (Hoffer y Osmond, 1960).

Sin embargo, por lo que respecta a la esquizofrenia las observaciones más interesantes han sido realizadas por David Horrobin del Instituto de Investigación Médica de Montreal, Canada. De todas las enfermedades mentales, la esquizofrenia (división de la mente) es el problema mental más importante, ya que en términos generales, afecta a una de cada 100 personas, independientemente de la raza, cultura y estado económico.

Aunque es relativamente fácil describir algunas de las características sicopatológicas más aparentes de las reacciones esquizofrenicas, ninguna de las definiciones ha recibido todavía aceptación universal. Debido a la heterogeneidad de las manifestaciones, tal vez fuera más exacto hablar del grupo de las esquizofrenias y no pensar que cada conjunto de reacciones anormales es una sola entidad patológica. Los síntomas generales de las reacciones esquizofrénicas se reconocen por la conducta poco común y extravagante que incluye una actitud distante respecto al ambiente, períodos de destructividad impulsiva y despliegues emocionales exagerados e

inmaduros. Aunque hay un contraste muy llamativo entre un individuo normal y un esquizofrénico, con frecuencia no existe una transición abrupta entre ambas personalidades.

Los estudios genéticos han mostrado en forma constante que si un miembro de la familia es esquizofrénico, el riesgo para los hermanos y los hijos es del 7 al 16% y en los padres del 5 al 10%. Se calcula que en las familias con los dos progenitores afectados, el riesgo en los hijos es del 40% (Kolb, 1971). Por otra parte, Kallman encontró que si el trastorno existe en un gemelo monocigótico, también aparecerá en el otro gemelo en el 85.8% de los casos. Si se considera el riesgo para un gemelo dicigótico, éste es de un 14% y (Kallman, 1953).

En 1971, Horrobin observó que la inyección de la hormona prolactina ocasionaba irritabilidad en los sujetos a quienes se le administraba (Horrobin, 1980). La relación de este hecho con la esquizofrenia es la de que desde tiempo atrás se sabía que todos los fármacos utilizados para el tratamiento de esta sicosis tenían como denominador común una gran capacidad para bloquear los efectos de la dopamina. Por lo tanto, se llegó a pensar que la esquizofrenia podía ser causada por un aumento en la actividad de la dopamina en el cerebro. Sin embargo, Horrobin parece haber llegado a una relación causal más directa.

En efecto, se sabía que la dopamina es un poderoso inhibidor de la secreción de prolactina por lo que con esta evidencia y la observación sobre producción de irritabilidad por la hormona, Horrobin empezó a estudiar los efectos de la prolactina en un tejido excitable que no tuviera la complejidad del cerebro. De esta manera, utilizando el músculo de los vasos sanguíneos de la rata, se llegó a la conclusión de que la prolactina promueve la conversión del ácido graso esencial dihomogamalinolénico (ADGL) en la prostaglandina  $E_1$  (PGE<sub>1</sub>) (Figura 3). Este descubrimiento ha sido trascendental ya que predice que los esquizofrénicos deben de tener niveles bajos de PGE<sub>1</sub> si es que efectivamente existe una relación causal entre la prostaglandina y el cuadro clínico. Dentro de las evidencias indirectas a favor de la hipótesis se encuentra el hecho de que los esquizofrénicos no desarrollan artritis ni los artríticos esquizofrenia, a pesar de que ambas enfermedades son muy comunes, lo que sugiere que cada enfermedad protege contra la otra. En la artritis reumatoide, hay una producción excesiva de prostaglandinas. Se sabe también que los esquizofrénicos son significativamente más resistentes al dolor. En este caso, las prostaglandinas juegan un papel fundamental en la génesis de la inflamación y el dolor.

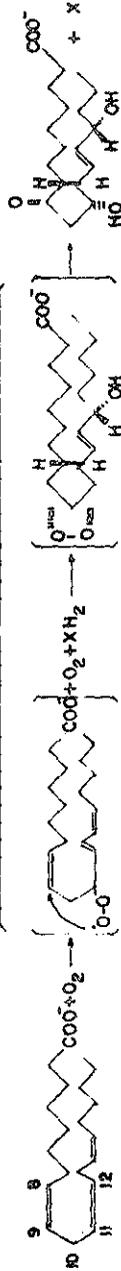
Independientemente de lo sugestivas que son las anteriores observaciones, en 1975 Abdullah y Hamadah publicaron sus estudios acerca de la síntesis de PGE<sub>1</sub> por las plaquetas

FIG. 3

TRANSFORMACION DEL ACIDO DIHOMOGAMALINOLENICO EN PROSTAGLANDINA E1

Prolactina  
↓  
Dopamina

Prostaglandina Sintetasa  
(Dioxigenasa + Monooxigenasa)



Acido Di Homogamalinolenico (ADHGL)

( 8,11,14 Eicosatrienoate)

Prostaglandina E1 (PGE1)

Dopamina: Inhibe la Secrecion de Prolactina.

Prolactina: Promueve la Transformacion de ADGL en PGE I

Drogas Antiesquizofrenicas: Bloquean a la Dopamina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de enfermos mentales sin tratamiento y controles normales -- (Abdullah y Hamadah, 1975). Las plaquetas de individuos normales, de pacientes maníacos y de pacientes depresivos respondieron al estímulo de ADP convirtiendo ADGL en PGE1. Sin embargo, las plaquetas de los esquizofrénicos no produjeron cantidades significativas de PGE1 aún a concentraciones elevadas de ADP.

En la actualidad, Horrobin intenta elevar por diferentes medios los niveles plasmáticos de PGE1 hasta valores normales en pacientes esquizofrénicos. De llegar a desaparecer el estado sicótico, se habrá demostrado claramente la etiología molecular de este padecimiento y se dispondrá entonces de una terapéutica eficaz y racional.

Una vez más, éste no es más que el primero de una serie de pasos que lentamente irán permitiendo tener una visión más completa e integral de los procesos mentales tanto fisiológicos como patológicos del hombre. Con ello, la mayor comprensión del fenómeno hombre a nivel molecular permitirá una contemplación más lógica y completa del mismo a nivel anatómico, fisiológico, evolutivo, psicológico y, finalmente, sociológico.

## CAPITULO II

### LA ENFERMEDAD DE ORINA DE JARABE DE ARCE

#### Introducción

En 1954 J. H. Menkes publicó sus observaciones acerca de una familia en la que cuatro de los seis hijos murieron durante las primeras semanas de vida. Todos ellos presentaron un cuadro clínico similar consistente en vómitos, convulsiones, hipertonicidad muscular, deterioro neurológico rápidamente progresivo y cetoacidosis. Además, el signo más sobresaliente fue un olor dulzón de la orina, similar al del azúcar quemada o al del jarabe de arce (Menkes, et al., 1954). Años más tarde, R. G. Westall y sus asociados (Westall, et al., 1957) reportaron sus hallazgos en un niño con importante daño cerebral y olor característico de la orina. Al analizar muestras de la sangre y orina de este paciente, descubrieron en ambas muestras niveles anormalmente elevados de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina (aminoácidos de cadena ramificada). En función del característico olor que acompaña a esta enfermedad fue denominada como enfermedad de orina de azúcar de arce. En la actualidad recibe el nombre de enfermedad de orina de jarabe de arce (y no de mil de maple, término utilizado en algunas malas traducciones).

En los pocos casos descubiertos posteriormente, el cuadro clínico se ha caracterizado de manera general por la ausencia de cualquier signología durante los primeros días - posteriores al nacimiento del niño afectado. Sin embargo, - al final de la primera semana de vida comienzan las primeras manifestaciones de la enfermedad: apatía e hiporexia progre- siva. Poco después aparecen los primeros signos neurológi- cos tales como disminución de los reflejos osteotendinosos, nistagmo, períodos alternos de hipertonicidad y flacidez así como convulsiones. A este cuadro se agregan más tarde alte- raciones en la ventilación pulmonar y sopor que rápidamente progresa hacia un estado comatoso y finalmente a la muerte. En algunos casos, el paciente ha llegado a sobrevivir a to- das estas manifestaciones pero con importantes secuelas neu- rológicas consistentes en un severo retraso sicomotor. Fre- cuentemente, la aparición del olor característico de la orina coincide con la de los signos neurológicos. Es posible - apreciar dicho olor no solo en la orina sino también en el - sudor y en el cerúmen del oído.

La incidencia de esta enfermedad es sumamente baja. Según datos publicados en 1973 por el Acta Paediatrica Scan- dinavica, su frecuencia para la población general europea es de 1 en 120,000 recién nacidos (anónimo, 1973). La cifra ob- tenida por el Programa de Detección de Massachusetts para la población del este de los Estados Unidos es de 1 en 290,000

recién nacidos (Levy, 1973; veáse también a Naylor y Guthrie, 1978).

Se han reportado casos en los Estados Unidos, Gran Bretaña, Francia, Suiza, Alemania, Noruega, Italia, Marruecos, Siria, India, Israel y Japón así como en emigrantes de Hong Kong. La aparente mayor concentración de casos en países médicamente avanzados bien podría deberse al hecho de que para su diagnóstico se requiere de una tecnología relativamente sofisticada.

#### Aspectos Hereditarios

El análisis de las historias clínicas permite establecer que la enfermedad es heredada de manera autosómica recesiva. En todos los casos los padres han sido clínicamente normales (algunas parejas han sido consanguíneas) aunque los estudios bioquímicos en algunos casos demostraron evidencias de heterocigocidad. Una interesante observación ha sido la de Dancis y McKnight en el sentido de que la actividad de decarboxilación de leucina- $l$ - $^{14}C$  involucrada en la enfermedad está frecuentemente más reducida en los padres que en las madres, fenómeno para el cual todavía no se cuenta con una explicación satisfactoria (Dancis, et. al., 1965; McKnight y Spence, 1972). De cualquier manera, esto no es más que un reflejo de la heterogeneidad de esta enfermedad.

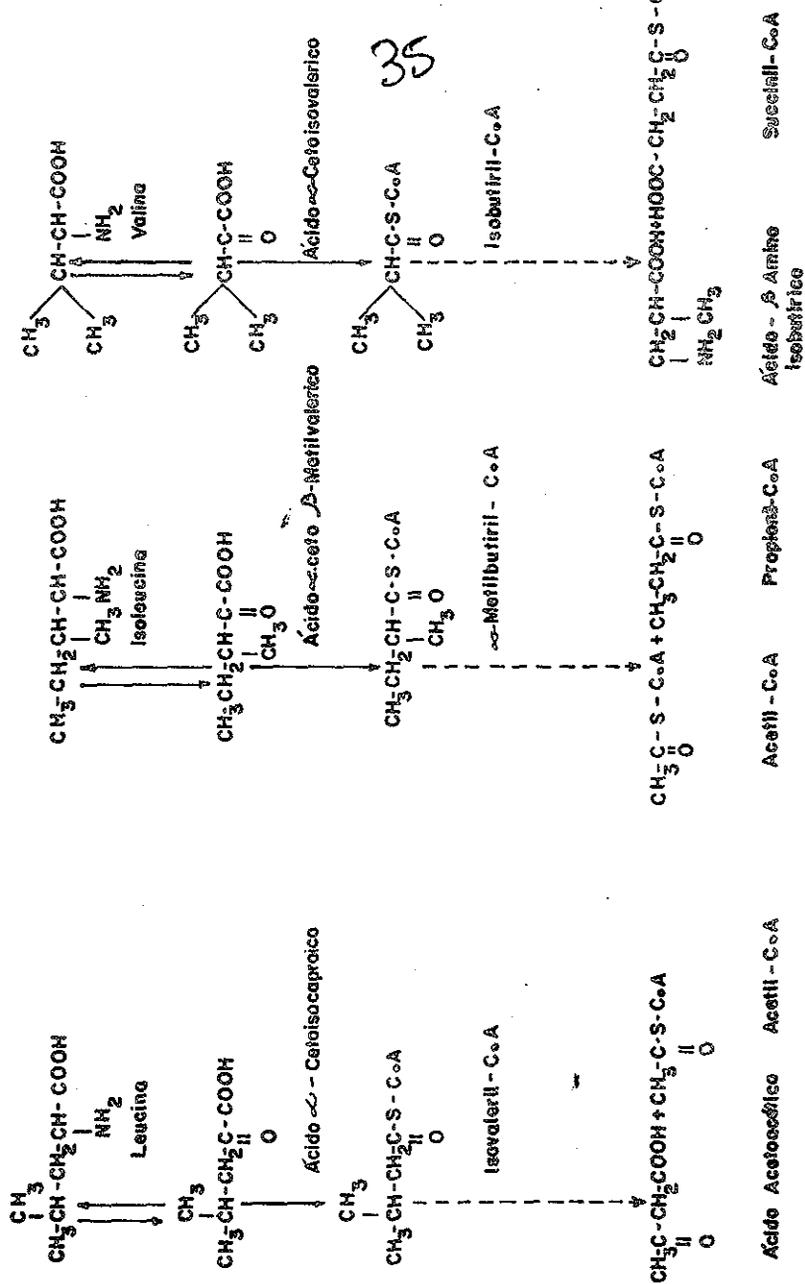
## El Error Metabólico

Dos años después de que Westall demostró una acumulación en plasma y orina de los aminoácidos de cadena ramificada, Menkes, MacKenzie y Dancis demostraron, de manera independiente, que también había una acumulación de los cetoácidos de cadena ramificada alfa-ceto-isocaproico, alfa-ceto-beta-metilvalérico y alfa-ceto-isovalérico, producidos por la transaminación de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina, respectivamente, primera transformación en la vía catabólica de estos aminoácidos (Figuras 4 y 5) (Menkes, 1959; MacKenzie y Woolf, 1959; Dancis, et al., 1959). Esta observación sugirió que el bloqueo metabólico no se localizaba a nivel de la transaminasa (la cual cataliza una reacción reversible) sino muy probablemente en el siguiente paso metabólico, esto es, en el de la decarboxilación oxidativa del cetoácido (Dancis, et al., 1959; MacKenzie y Woolf, 1959; -- Menkes, 1959). La confirmación de esta sospecha fue realizada por Dancis y sus asociados al estudiar el metabolismo de estos aminoácidos en leucocitos de pacientes afectados (Dancis, et al., 1963). Descubrió que si bien la transaminación de dichos aminoácidos ocurría de manera normal, los cetoácidos resultantes no eran decarboxilados apreciablemente.

## Patología

Los estudios histopatológicos del tejido nervioso

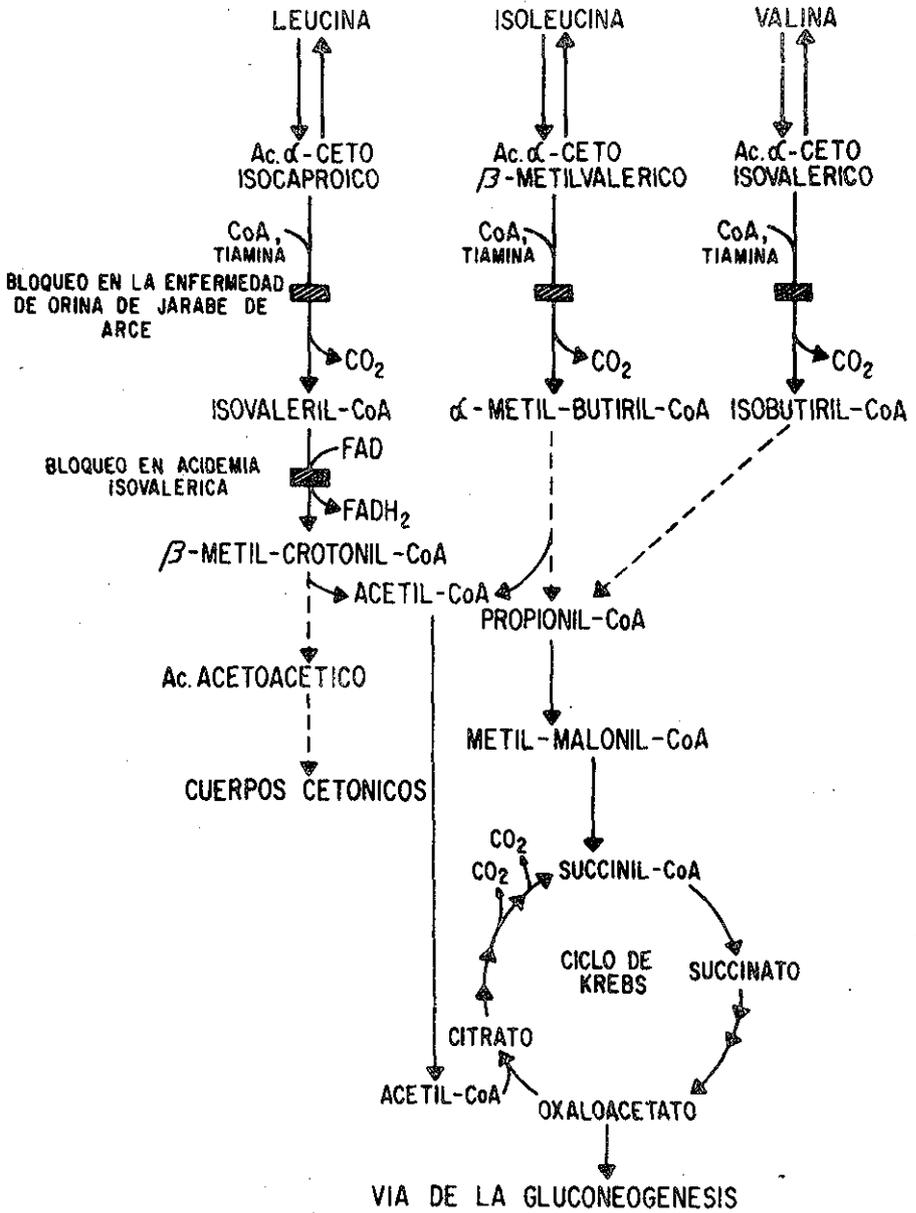
FIG. 4



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

FIG: 5

36



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

de pacientes que fallecieron a consecuencia de la enfermedad revelan diferentes tipos de lesiones dependiendo del momento en que haya ocurrido la muerte. Cuando ésta ocurre dentro de las primeras semanas de vida no se encuentra prácticamente -- ninguna anormalidad, excepción hecha de cierto grado de esponjamiento de la sustancia blanca como una posible consecuencia del edema. En el caso de que la muerte ocurra más tardíamente, los hallazgos más importantes son una deficiencia mielinización y una astrocitosis difusa. El hecho de que no se haya podido identificar a ningún producto de degradación de la mielina sugiere que la deficiente mielinización debe de ser consecuencia de una interrupción postnatal de su síntesis. Resulta interesante notar que si el paciente recibió un tratamiento dietético adecuado, la deficiencia en la mielinización no llega a ocurrir (Linneweh y Socher, 1965).

Los análisis químicos del cerebro revelan una reducción total de lípidos, incluidos los cerebrósidos y proteolípidos. Se ha sugerido que posiblemente la elevación de los aminoácidos en esta enfermedad interfiera con la síntesis normal de los proteolípidos lo que a su vez condicionaría una deficiente síntesis de mielina (Prensky y Moser, 1966).

De cualquier manera, dista mucho de estar clara la relación entre estos hallazgos histopatológicos y químicos y el cuadro clínico, ya que si bien podrían explicar el deterioro mental permanente en pacientes no tratados, no explica la

aparición de los cuadros neurológicos agudos en pacientes -- bajo tratamiento pero con un descontrol transitorio de sus niveles plasmáticos de aminoácidos. Por otro lado, la favorable respuesta al tratamiento a base de dietas bajas en aminoácidos de cadena ramificada así como la rápida instalación del cuadro clínico en pacientes con un tratamiento descompensado hacen pensar que dicho cuadro clínico es producto más bien de la elevación anormal de algún o algunos metabolitos y no por la deficiencia de aquellos distales al bloqueo metabólico. A este respecto, múltiples observaciones clínicas -- hacen suponer que la sintomatología aguda está más directamente relacionada con los niveles elevados de leucina que con los de isoleucina y valina. Aunque no es claro todavía si el "agente tóxico" más importante es la leucina, su cetoácido, ambos compuestos o todos los aminoácidos y cetoácidos de cadena ramificada, se tiene evidencia de que solo el ácido -- alfa-ceto-isocaproico inhibe la mielinización del cerebelo -- en cultivo (Silberberg, 1969). Puede también pensarse que -- los niveles elevados de los tres aminoácidos alteren significativamente la poza extra e intracelular de aminoácidos con los consecuentes trastornos en sus sistemas de transporte y síntesis de proteínas.

Sin embargo, estudios bioquímicos efectuados en relación con la pelagra han aportado datos sumamente interesantes y sugestivos. Durante muchos años se pensó que la pe

lagra era una enfermedad causada por la ingesta de una dieta pobre en ácido nicotínico (como es sabido, el maíz es un alimento pobre en niacina y con un elevado contenido de leucina -12 a 14%). En 1967, Belavady llevó a cabo un experimento en el que a perros de poca edad se les administró una dieta con 20% de caseína, 3.6% de leucina y desprovista de ácido nicotínico. Entre los 30 y 90 días de iniciado el experimento, los animales desarrollaron un cuadro clínico de lengua negra, equivalente a la pelagra humana. Sin embargo, cuando el mismo experimento se realizó con una concentración dietética de leucina de 1.5% (sin ácido nicotínico), ningún animal desarrolló un cuadro clínico de lengua negra. La administración de 300 microgramos de niacina (y leucina ahora el 2.75) no fue suficiente para evitar la aparición de la enfermedad (Belavady, et al., 1967).

Años antes, Gopalan y asociados, al sospechar una posible relación causal entre la leucina y la pelagra, administraron de 20 a 30 g del aminoácido a 2 pacientes, lo que fue acompañado por un temporal pero marcado deterioro del estado mental, el cual podía ser corregido al suspender la ingesta de leucina y administrar simultáneamente ácido nicotínico (Gopalan y Srikantia, 1960). Más tarde, estas observaciones fueron confirmadas con un número mayor de pacientes. En todos ellos se observó depresión, inestabilidad emocional e insomnio importante. El estudio del patrón electroencefalográfico mostró un exceso de la actividad theta o delta, la --

cual desapareció y se restableció la actividad normal alfa - después de 10 a 40 días de tratamiento con ácido nicotínico. Si bien todos los pacientes que mostraron manifestaciones -- clínicas mentales tuvieron un patrón electroencefalográfico anormal, lo opuesto no ocurrió invariablemente (Srikantia, et al., 1968). Dado que la administración de leucina a sujetos normales bajo estas condiciones experimentales no produjo ningún cambio mental, parecería que los pelagrios son más sensibles a la leucina y responden a ella en un tiempo relativamente corto, o bien, dado que ya han estado por un tiempo prolongado expuestos a una dieta elevada de leucina, la - administración de leucina extra podría precipitar cambios más rápidamente.

Sin embargo, los pelagrios excretan por orina bajas cantidades del ácido 5-hidroxiindolacético, producto final del metabolismo de la serotonina. La administración de leucina en cantidades elevadas tanto a sujetos normales como a pelagrios, ocasiona una depresión de la excreción urinaria de este metabolito (Belavady, et al., 1963). Si se considera además que ratas alimentadas con una dieta conteniendo leucina al 5% muestran una considerable disminución de su serotonina cerebral (Yuwiler, 1965) podría suponerse que los cambios mentales observados en los pelagrios posiblemente estén relacionados con el metabolismo de la serotonina. En efecto, - todos aquellos pelagrios que manifiestan depresión mental e

inestabilidad emocional poseen niveles muy bajos de serotonina en sus plaquetas, invariablemente por debajo de 0.5 microgramos por miligramo de proteína (Krishnaswamy y Ramanamurthy, 1970). Por otro lado, aquellos pelagrinós sin cambios mentales tienen niveles similares a los de controles normales, con un valor medio de 0.57 microgramos por mg de proteína. El ácido nicotínico y la nicotinamida en pequeñas cantidades puede aumentar el contenido cerebral de serotonina, aunque en grandes dosis tiene un efecto opuesto. Como se recordará, la serotonina (5-hidroxitriptamina) es sintetizada a partir de triptófano y juega un papel fundamental como transmisor sináptico en diversas porciones del cerebro.

Experimentos realizados por Kaladhar (Kaladhar, 1974) con ratas bajo una dieta con leucina al 3%, demostraron que en estos animales la captación de triptófano por las neuronas así como la concentración del mismo en los sinaptosomas era normal. Por otra parte, aunque la 5-hidroxilación del triptófano parece ser el paso limitante en la biosíntesis de serotonina, la actividad de la 5-hidroxilasa no se alteró en ratas alimentadas con una dieta con leucina al 3%. Tampoco se encontró ninguna alteración a nivel de la 5-hidroxitriptamina decarboxilasa. Parecería ser entonces que los bajos niveles cerebrales de serotonina no son debidos ni a una deficiente captación neuronal del triptófano ni tampoco a una deficiente síntesis de la misma.

Sin embargo, la captación de serotonina por los sinaptosomas sí está significativamente reducida (Kaladhar, 1972) y esto es, probablemente, el factor crucial en la reducción de la serotonina cerebral ya que cuando ésta no es recapturada por las vesículas sinápticas, es inmediatamente destruída por la monoaminoxidasa.

A la luz de estas observaciones resulta interesante considerar la posible relación causal entre niveles permanentemente elevados de leucina en un niño sin tratamiento, en los momentos en que su sistema nervioso se encuentra todavía en un proceso de maduración y es, por lo tanto, sumamente sensible a cualquier tipo de insulto, permitiendo la aparición de las manifestaciones neurológicas.

#### Metabolismo de los Aminoácidos de Cadena Ramificada

Como ya fue mencionado, el hecho de haber encontrado elevados a los tres aminoácidos esenciales de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina así como a sus respectivos cetoácidos alfa-ceto-isocaproico, alfa-ceto-beta-metilvalérico y alfa-ceto-isovalérico en muestras de sangre y orina de individuos afectados sugirió que el bloqueo en la vía catabólica de estos aminoácidos se encontraba a nivel de la segunda transformación, esto es, de la decarboxilación oxidativa y no a nivel de su primera modificación, una transaminación.

En el ser humano, el principal destino de los aminoácidos de cadena ramificada es su incorporación a la síntesis de proteínas. Aquellos aminoácidos ramificados que no llegan a ser utilizados en esta vía metabólica pueden ser derivados por una vía metabólica diferente hacia la producción de acetil-CoA, acetoacetil-CoA, propionil-CoA y succinil-CoA, metabolitos que a su vez pueden ser empleados en muchos otros caminos metabólicos (Figura 4). Esta transformación implica la participación coordinada de múltiples enzimas tanto citoplásmicas como mitocondriales así como una compleja interrelación metabólica resultante de la participación de varios órganos y modulada por el estado metabólico particular de cada órgano y del organismo en general.

### Transaminación

La primera transformación sufrida por los aminoácidos de cadena ramificada durante su catabolismo consiste en una conversión reversible al alfa-ceto-ácido correspondiente por medio de una desaminación oxidativa o por una transaminación. Este paso, como ya se dijo, no se encuentra alterado en los pacientes con enfermedad de orina de jarabe de arce.

La desaminación oxidativa es catalizada por una L-amino-oxidasa con la consecuente liberación de amoníaco. Sin embargo, la poca actividad de esta enzima así como su limitada distribución hacen muy poco importante este paso en los mamíferos. La transaminación difiere de la desaminación en

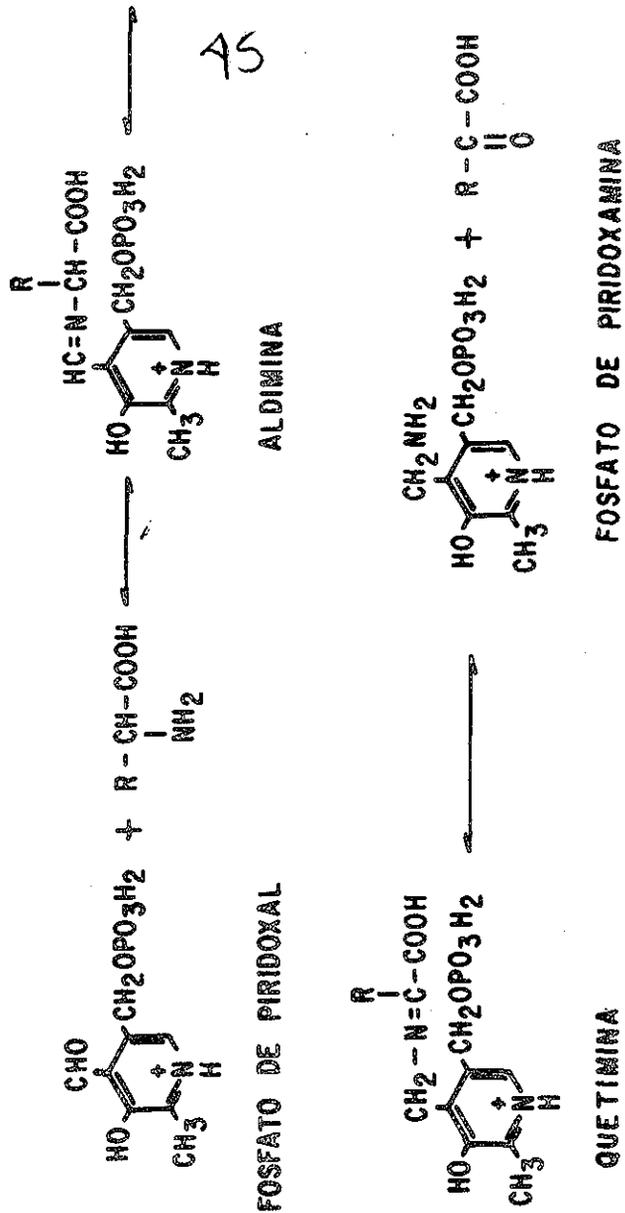
el sentido de que el grupo amino no se libera en forma de -- amoníaco sino que es transferido a un aceptor de grupos amino, frecuentemente alfa-ceto-glutarato, por medio de una coenzima constituida por fosfato de piridoxal (Figura 6). De esta manera, el aminoácido transaminado se convierte en un - alfa-ceto-ácido.

Aunque se han reportado múltiples casos en los que la especificidad de la transaminasa parece ser muy alta para cada aminoácido ramificado, aún en estos casos dichas transaminasas retienen cierta actividad cuando el receptor o donador del grupo amino es reemplazado por un sustrato de estructura similar. Por otra parte, existen también múltiples reportes sobre transaminasas con muy poca especificidad. De cualquier manera, estudios cuidadosos realizados con transaminasa de corazón de cerdo parecen demostrar que una sola -- enzima transamina a los tres aminoácidos de cadena ramificada. Entre otras observaciones, destaca el hecho de que las actividades relativas hacia leucina, isoleucina y valina permanecieron constantes durante los siete estadios de purificación (Taylor y Jenkins, 1966). Estas observaciones deberán de ser conciliadas en el futuro con el hecho de que en el error innato del metabolismo conocido como hipervalinemia, el sujeto afectado es incapaz de transaminar únicamente a valina. Esta observación sugeriría la existencia de una sola - transaminasa específica para valina, al menos en el hombre.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIG:6

PASOS INTERMEDIOS EN LA REACCION DE TRANSAMINACION



Independientemente de una o varias transaminasas, - la evidencia con la que se cuenta en la actualidad prácticamente no deja lugar a duda sobre su distribución tisular. En la rata, la actividad de transaminación es particularmente alta en el tejido renal y cardíaco. El músculo esquelético posee también una considerable actividad de transaminación mientras que el hígado prácticamente no realiza ninguna transaminación (Ichihara y Koyama, 1966).

Por lo que respecta a su distribución intracelular, estos mismos investigadores reportan una considerable actividad tanto en el sobrenadante como en la fracción mitocondrial lo que sugiere la posibilidad de la existencia de dos especies enzimáticas con localizaciones diferentes.

#### Decarboxilación Oxidativa

El cetoácido producido por la transaminación es posteriormente decarboxilado oxidativamente. Como ya fue mencionado, es precisamente este paso metabólico el que se encuentra alterado en los individuos con la enfermedad de orina de jarabe de arce.

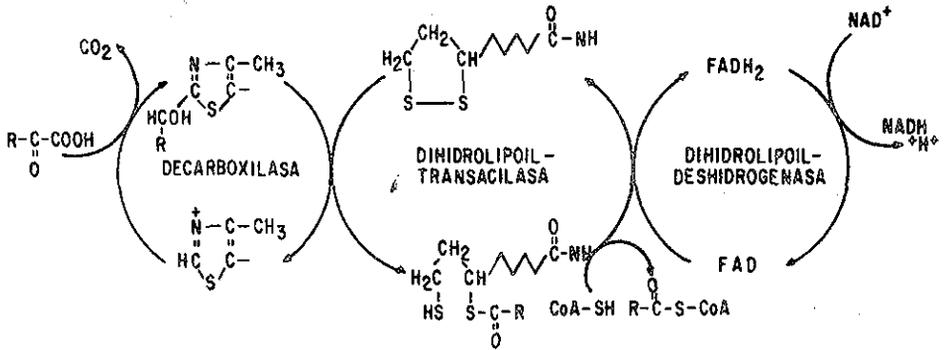
Antes de que la enzima responsable de dicha decarboxilación (deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada -DCCR-) pudiera ser finalmente purificada, se presumía, en función de evidencia indirecta, que debería de tener una estructura y mecanismos de reacción análogos a los de la piruva

to y alfa-ceto-glutarato deshidrogenasa. Esta evidencia se basaba fundamentalmente en experimentos diseñados para determinar los requerimientos de cofactores de complejos enzimáticos tanto bacterianos como de mamíferos los cuales demostraron en algunos casos, mas no en todos, requerimientos similares. En función de dicha analogía se consideró a la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada como un enorme complejo multienzimático constituido por la asociación de varias decarboxilasas, transacilasas y dihidrolipioloxidoreducetasas (Dancis, 1978; Danner, y Elsas, 1975; Goedde, 1967; -- Reed, 1957).

En un paso inicial, la coenzima de la decarboxilasa, pirofosfato de tiamina, se une covalentemente al cetoácido en el momento de ocurrir la decarboxilación (Figura 7). - El grupo carboxilo es liberado como bióxido de carbono. El segundo paso de este proceso enzimático consiste en la oxidación del complejo pirofosfato de tiamina por el ácido lipoi-co, grupo prostético de la transacilasa. El ácido lipoico se une covalentemente al fragmento decarboxilado con lo que la tiamina es liberada completándose de esta manera la oxidación del cetoácido al ácido simple. Un tercer cofactor participante en esta secuencia de reacciones es la coenzima A, la cual desplaza al ácido lipoico reducido y forma a la acil-CoA derivada del alfa-ceto-ácido decarboxilado (Figura 7). A su vez, el ácido lipoico es reoxidado gracias a la actividad

FIG: 7

Decarboxilacion Oxidativa de los Cetoacidos



Reacciones Individuales:

1.  $R-C(=O)-COOH + EnzA-TPP-H \longrightarrow EnzA-TPP-CH(R)-C(=O)OH + CO_2$
2.  $EnzA-TPP-CH(R)-C(=O)OH + EnzB-Lip \begin{bmatrix} S \\ | \\ S \end{bmatrix} \longrightarrow EnzA-TPP-H + EnzB-Lip \begin{bmatrix} S-C(=O)-R \\ | \\ SH \end{bmatrix}$
3.  $EnzB-Lip \begin{bmatrix} S-C(=O)-R \\ | \\ SH \end{bmatrix} + CoA-SH \longrightarrow EnzB-Lip \begin{bmatrix} SH \\ | \\ SH \end{bmatrix} + CoA-S-C(=O)-R$
4.  $EnzB-Lip \begin{bmatrix} SH \\ | \\ SH \end{bmatrix} + EnzC-FAD \longrightarrow EnzB-Lip \begin{bmatrix} S \\ | \\ S \end{bmatrix} + EnzC-FADH_2$
5.  $EnzC-FADH_2 + NAD^+ \longrightarrow EnzC-FAD + NADH + H^+$

Reaccion Total:



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de la dihidrolipoil oxidoreductasa (también denominada dihidrolipoil deshidrogenasa), la cual utiliza FAD como coenzima. Por último, el FAD reducido cede sus electrones a una molécula de NAD.

Una pérdida funcional de cualquiera de las tres enzimas mencionadas, traería como consecuencia un bloqueo de magnitud variable a nivel de este paso metabólico. Por otra parte, se sabe que la misma dihidrolipoil deshidrogenasa de este complejo (EC 1.6.4.3.) forma parte también del complejo de la piruvato deshidrogenasa y del de la alfa-ceto-glutarato deshidrogenasa, pasos metabólicos de vital importancia que no se encuentran afectados en la enfermedad de orina de jarabe de arce. Por lo tanto, la alteración en esta enfermedad solo podrá localizarse a nivel de las subunidades de decarboxilación o de transacilación. Es importante mencionar el caso de un paciente que falleció a los 7 meses de edad debido a un deterioro neurológico progresivo y acidosis metabólica persistente. El estudio postmortem de la actividad de la piruvato deshidrogenasa en diferentes tejidos (hígado, cerebro, riñón, músculo esquelético y corazón) demostró una disminución de la misma, la cual fue debida a una deficiente actividad de la dihidrolipoil deshidrogenasa. Como era de esperarse por lo mencionado líneas arriba, las actividades de la alfa-ceto-glutarato deshidrogenasa y de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada también se encontraron considerablemente disminuidas (Taylor, et al., 1978).

Por lo mencionado puede inferirse que uno de los métodos utilizados para la medición de la actividad de esta enzima consiste en cuantificar la producción de NAD reducido. De esta manera, es posible estudiar la actividad del complejo multienzimático como un todo. Sin embargo, este método posee la desventaja de que para poder ser utilizado se requieren preparaciones razonablemente puras de la deshidrogenasa o muy activas ya que la natural turbidez de las preparaciones impuras dificulta considerablemente las mediciones espectrofotométricas.

Otro método que es frecuentemente utilizado consiste en cuantificar la producción de  $\text{CO}_2$  radioactivo cuando a la mezcla de reacción conteniendo la enzima, se le ha agregado el sustrato marcado en el grupo carboxilo. El empleo de uno de los cetoácidos marcados es, claro está, la elección más lógica. Sin embargo, posee el inconveniente de que los cetoácidos son sustancias muy inestables que tienden a decarboxilarse espontáneamente con mucha facilidad. Por ello mismo, tampoco se distribuyen comercialmente por lo que hay que prepararlos en el laboratorio a lo sumo unas cuantas semanas antes de realicar la medición. Por el contrario, cuando esta medición se realiza en células intactas y no en homogenados, es posible aprovechar la transaminación normal de la célula y utilizar al precursor del sustrato, esto es, al aminoácido marcado, el cual es razonablemente estable. Esta

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

última metodología posee el inconveniente de que al emplearla no solo se está midiendo realmente la decarboxilación del cetoácido, sino también varios pasos metabólicos anteriores tales como el transporte del aminoácido a través de la membrana celular, su transaminación, el transporte del cetoácido a través de la membrana mitocondrial, etc.

Por otro lado, el uso de aminoácidos marcados, al permitir el empleo de células intactas, hace posible estar más cerca de las condiciones in vivo a nivel celular y puede, de esta manera, tener ventajas como modelo clínico.

A este respecto es interesante señalar las diferencias en actividad enzimática observadas por Dancis y su grupo utilizando aminoácidos marcados y fibroblastos intactos y por Wendel y asociados al emplear cetoácidos de cadena ramificada marcados radioactivamente y fibroblastos también intactos (Dancis, et al., 1977). Al alcanzar concentraciones elevadas del cetoácido en la mezcla de reacción (5 mM en adelante) Wendel y sus colegas observaron que la mayoría de las muestras celulares estudiadas de pacientes enfermos llegaban a mostrar una actividad enzimática muy cercana a valores normales y aún dentro de los valores normales. En función de este hallazgo, postularon la hipótesis de que en realidad existen dos deshidrogenasas de cetoácidos de cadena ramificada: una con alta afinidad por el sustrato y otra con una baja afinidad. Por lo tanto, los pacientes con la -

enfermedad de orina de jarabe de arce tendrían afectada la enzima con una baja  $K_M$  pero no aquella con una  $K_M$  elevada -- (Wendel, et al., 1975).

Las observaciones de Wendel fueron confirmadas más adelante por Dancis, quien también observó que, a diferencia de lo obtenido al emplear cetoácidos, cuando se emplean aminoácidos marcados, no importa la concentración alcanzada en la mezcla de reacción, siempre podrán diferenciarse aquellos fibroblastos obtenidos de pacientes de los controles normales (Dancis, et al., 1977). Además, por arriba de una concentración de 1.5 mM (de leucina) ya no hay un aumento en la producción de bióxido de carbono radioactivo ni en los fibroblastos normales ni en los de pacientes, lo que sugiere un factor limitante proximal al paso de decarboxilación tal como el transporte del aminoácido hacia o dentro de la célula y/o la velocidad de transaminación. De existir las dos actividades enzimáticas de afinidad diferente postuladas por Wendel y sus asociados, Dancis estaría midiendo la actividad de decarboxilación de la enzima con alta afinidad, la cual sería, presumiblemente, la fisiológicamente efectiva y la que estaría mutada en la enfermedad de orina de jarabe de arce.

Además de los dos métodos señalados líneas arriba empleados para la determinación de la actividad enzimática de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada, también es posible cuantificar específicamente la actividad de

la primera enzima del complejo multienzimático, la decarboxilasa, mediante el empleo de aceptores artificiales de electrones tales como el ferricianuro. Sin embargo, este último método ha sido muy poco utilizado, en la determinación de la actividad de esta enzima, a diferencia de lo ocurrido con la piruvato deshidrogenasa, en la que se ha empleado más extensamente.

### Deshidrogenasa de Cetoácidos de Cadena Ramificada

#### Localización tisular, celular y purificación

La distribución tisular de este complejo multienzimático es muy amplia. Las máximas actividades han sido observadas en el hígado, riñón, corazón e intestino (Connelly, et al., 1968; Dancis, et al., 1961). Además, Dancis demostró la presencia de esta enzima en leucocitos y fibroblastos humanos en cultivo (Dancis, et al., 1963), mientras que otros investigadores (Elsas, et al., 1974; Wendel, et al., 1973) pudieron observarla en células amnióticas cultivadas lo que abrió la posibilidad de realizar el diagnóstico prenatal de esta enfermedad.

Por lo que respecta a su localización intracelular, evidencias aportadas por diferentes trabajos (Johnson y Connelly, 1972; Wolhueter y Harper, 1970) indican una localización mitocondrial. Aunque se ha llegado a observar una li

gera actividad en las fracciones citoplásmicas, ésta muy --- probablemente es contaminación de origen mitocondrial durante el proceso de homogeneización y fraccionamiento subcelular.

La observación, confirmada en todos los casos reportados, de que los tres aminoácidos de cadena ramificada y sus respectivos cetoácidos se encuentran elevados en la sangre y orina de los pacientes no tratados así como el tipo de herencia de esta enfermedad (monogénica recesiva) sugiere que la descarboxilación de los tres cetoácidos es realizada por una misma deshidrogenasa. Sin embargo, Connelly y sus asociados reportaron haber separado por lo menos dos actividades enzimáticas en fracciones semipurificadas (unas 70 veces) de hígado de bovinos (Connelly, et al., 1968). Una de dichas actividades es específica para los ácidos alfa-cetoisocaproico y alfa-ceto-metilvalérico y se localiza en la fracción soluble, mientras que la otra, para el ácido alfa-ceto-isovalérico, permanece en todo momento en el sedimento. En investigaciones subsecuentes se confirmó que las actividades enzimáticas relativas de alfa-ceto-isocaproico y alfa-ceto-beta-metilvalérico copurificaron de manera constante -- después de varios pasos de purificación, lo que apoyó la suposición de que por lo menos en hígado bovino un solo complejo enzimático descarboxilaba a estos dos cetoácidos y un se--

gundo complejo decarboxilaría a alfa-ceto-isovalérico (Bowden y Connelly, 1968).

Unos años antes, Danner y Bowden habían reportado la separación de una actividad hacia alfa-ceto-isocaproico de otra a alfa-ceto-isovalérico en el hígado de la rata (Danner y Bowden, 1966). Por otra parte, investigadores alemanes anunciaron poco después haber podido separar en hígado de bovinos tres actividades enzimáticas diferentes, cada una de ellas -- aparentemente con un pH óptimo, utilización de coenzimas, valores de  $K_M$  y  $K_I$  y modo de inhibición, diferentes (Goedde y Keller, 1967). Sin embargo, los detalles sobre el proceso de purificación y los experimentos de cinética enzimática nunca llegaron a ser publicados.

Si los hallazgos reportados para órganos de diferentes mamíferos pueden llegar a ser extrapolados en un momento dado al ser humano, surge inmediatamente una pregunta ¿De que manera, existiendo por lo menos dos deshidrogenasas de cetoácidos de cadena ramificada diferentes, una sola mutación afecta a ambas enzimas ocasionando la acumulación de los tres cetoácidos y sus respectivos aminoácidos?. Una posible respuesta podría consistir en suponer la existencia de dos (o tres) decarboxilasas diferentes agrupadas en un mismo complejo multienzimático (la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada) y compartiendo alguna cadena polipeptídica común a

las dos (o a las tres) y esencial para el correcto funcionamiento de dichas decarboxilasas. Una mutación en el gene -- que codificara para dicha cadena polipeptídica produciría, -- consecuentemente, una deficiente actividad de las dos (o -- tres) enzimas diferentes.

Podría suponerse también, por ejemplo, que el correcto funcionamiento del complejo requiriera de una apropiada asociación a la membrana mitocondrial. Si en dicha asociación participara alguna cadena polipeptídica, la mutación -- del gene que la codifique podría, en un momento dado, afectar el funcionamiento de la deshidrogenasa, independientemente -- del tipo de decarboxilasas que contenga. A este respecto se cuenta con varios ejemplos ilustrativos entre los que destaca el caso de la glucuronidasa. Como se recordará, aunque el -- papel metabólico preciso de esta enzima se desconoce, evidencias recientes sugieren que participa en la degradación de -- glicosaminoglicanos y en la hidrólisis de ciertos metabolitos conjugados (Lusis y Paigen, 1977). Se ha descubierto -- que para su correcto funcionamiento en el retículo endoplásmico del hepatocito y células renales del ratón es indispensable que se encuentre unida a la membrana de dicho organelo ya que de no ser así será rápidamente degradada (Ganschow y Paigen, 1967). La proteína que une a la glucuronidasa con -- la membrana microsomal es un polipéptido con peso molecular de 64,000 bautizado por Paigen con el nombre de egasina.

Por otra parte, la consideración de una serie de factores característicos de la enfermedad de orina de jarabe de arce permiten elaborar otra posible explicación a este problema. Los niveles plasmáticos de alfa-ceto-isocaproico y leucina así como los del alfa-ceto-beta-metilvalérico y los de isoleucina son habitualmente de 13 a 20 veces mayores que los valores normales en este tipo de pacientes, mientras que el nivel del ácido alfa-ceto-isovalérico así como el de valina sólo llega a ser de 4 a 7 veces mayor que lo normal. Más aún, en pruebas de tolerancia a cargas de estos aminoácidos se ha notado que la administración de valina no tiene prácticamente ningún efecto en los niveles plasmáticos de leucina o isoleucina y no llega a desencadenar ni las manifestaciones neurológicas ni la aparición del olor característico de la enfermedad. Sin embargo, cuando se administra leucina se produce una marcada elevación de los niveles plasmáticos de valina (400% en 24 horas) e isoleucina (100% en 24 horas) así como una rápida aparición de las manifestaciones neurológicas, sin que se lleguen a acompañar del olor característico. Este último solo se hace manifiesto después de la administración de isoleucina (Snyderman, 1964).

Todas estas observaciones han sido consideradas por algunos autores como sugestivas de que la decarboxilasa del ácido alfa-ceto-isovalérico no está directamente afectada por la alteración génica y de que el bloqueo primario es a nivel

58

de la enzima involucrada en la decarboxilación del ácido alfa-ceto-isocaproico y alfa-ceto-betametilvalérico con la consiguiente inhibición de la actividad hacia el ácido alfa-ceto-isovalérico por la acumulación del alfa-ceto-isocaproato (Bowden y Connelly, 1968).

Esta posible explicación ha sido refutada en función de varias observaciones. En primer lugar, la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada por leucocitos de pacientes con niveles plasmáticos controlados por el tratamiento dietético, continúa siendo anormal. Por otra parte, el metabolismo de fibroblastos en cultivo de pacientes con esta enfermedad también continúa siendo anormal para los tres aminoácidos. Es muy difícil pensar que en los medios de cultivo de estas células se alcancen concentraciones "inhibitorias" de alfa-ceto-isocaproato.

Finalmente, el descubrimiento de variantes clínicas y bioquímicas de la enfermedad de orina de jarabe de arce hacen difícil de sostener a esta hipótesis.

Es evidente que una respuesta satisfactoria al problema del número exacto de deshidrogenasas de cetoácidos de cadena ramificada sólo puede obtenerse a partir del análisis de fracciones enzimáticas purificadas a homogeneidad. Sin embargo, en todos los trabajos considerados líneas arriba solo

se alcanzaron niveles muy bajos de purificación que oscilaron entre un 0.1% a un 1.0% de la actividad específica reportada para los complejos altamente purificados de la piruvato y alfa-ceto-glutarato deshidrogenasas. A pesar de los esfuerzos de múltiples investigadores por conseguir preparados razonablemente puros de la(s) enzima(s), esto no se conseguía, aparentemente por la extrema labilidad de la misma. Aún los procedimientos para homogeneizar las células debían de ser lo menos agresivos posibles para que la actividad enzimática no se viera considerablemente reducida.

Finalmente, en 1978 Lester J. Reed y sus asociados (Petit, et al., 1978) lograron obtener, a partir de riñón bovino actividades enzimáticas purificadas o homogeneidad aparente (250 a 300 veces a partir de extractos mitocondriales). Dicho grado de purificación solo fue posible al agregar a la fracción purificada la tercera enzima del complejo, esto es, la dihidrolipoil deshidrogenasa, la cual se disocia muy fácilmente del complejo de la deshidrogenasa durante el procedimiento de purificación. Esta última enzima también fue obtenida por Reed y su grupo a partir de extractos mitocondriales de riñón bovino (Petit, et al., 1978).

Los estudios realizados con esta preparación sobre patrones de velocidad de sedimentación, cromatografía de exclusión molecular, así como el hecho de que las proporciones de actividades específicas para los tres cetoácidos (1.4:1.0:

2.2; alfa-ceto-isocaproato, alfa-ceto-beta-metilvalerato, alfa-ceto-isovalerato, respectivamente) se mantuvieron siempre constantes a lo largo de todo el proceso de purificación, sugieren de manera importante que un solo complejo (al menos - en riñón bovino) realiza la decarboxilación de los tres cetoácidos. Los valores de  $K_M$  aparentes obtenidos con dicho complejo fueron de 50, 37 y 40 micromolar respectivamente. Se observó también que bajo las condiciones en las que la piruvato deshidrogenasa cinasa fosforila a dicho complejo inactivándolo, la actividad de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada no fue modificada en lo más mínimo. Estas observaciones parecen indicar que dicha deshidrogenasa no es regulada a través de la fosforilación y defosforilación.

De cualquier manera, estas observaciones no invalidan la posibilidad de que en un mismo complejo multienzimático co-existan simultáneamente dos o tres tipos diferentes de decarboxilasas. A este respecto resulta interesante señalar que al someter a electroforesis (poliacrilamida/dodecil sulfato de sodio) a la subunidad del complejo correspondiente a la decarboxilasa, pudieron separarse dos bandas con pesos moleculares diferentes (35,000 y 46,000). La interpretación de los autores a esta observación consiste en suponer - que el único tipo de decarboxilasa existente es una proteína constituida por dos subunidades. Sin embargo, todavía no es posible descartar de manera definitiva con los datos disponi

bles la posibilidad de que dichas bandas corresponden en realidad a dos decarboxilasas diferentes asociadas en el mismo complejo de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada. La respuesta definitiva a este problema se tendrá una vez que se realicen los estudios apropiados de cinética enzimática.

La separación de los componentes de este complejo multienzimático y su posterior estudio por cromatografía de exclusión molecular, velocidad de sedimentación y microscopía electrónica han confirmado el supuesto parecido estructural de este complejo con el de la piruvato y alfa-ceto-glutarato deshidrogenasas. El componente de la transacilasa tiene la apariencia de un cubo, constituido probablemente por unas 24 cadenas polipeptídicas idénticas de 52,000 de peso molecular, mientras que las moléculas de la decarboxilasa parecen distribuirse sobre la superficie del cubo de manera análoga a la de los complejos mencionados.

#### Interacciones Metabólicas

Recientemente se ha empezado a estudiar desde una perspectiva más integral a la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada a través de algunos de sus metabolitos moduladores así como de la interacción los cetoácidos (sustratos de este complejo) con otras vías metabólicas de importancia para la economía celular. Como puede esperarse de este tipo

de estudios, los resultados son frecuentemente complejos y difíciles de interpretar.

Utilizando hepatocitos aislados, de ratas en ayuno - de 18 a 24 horas, Williamson y sus asociados llegaron a una serie de observaciones de considerable interés (Rode, et al., 1979; Williamson, et al., 1979). En primer lugar, confirmaron los hallazgos de anteriores investigadores (veáse, por ejemplo a Danner, et al., 1978) en el sentido de que los cetoácidos -- ramificados inhiben competitivamente entre sí su decarboxilación. Observaron también que en condiciones basales la acetil CoA generada a partir del ácido alfa-ceto-isocaproico es derivada fundamentalmente hacia la formación de cuerpos cetónicos y solo alrededor de un 30% es oxidada en el ciclo de Krebs --- (Williamson, et al., 1979). Más aún, cuando estos experimentos son realizados en presencia de piruvato, éste último suprime dicha oxidación, a diferencia del lactato, el cual la estimula. Esta estimulación es debida a una baja actividad de la piruvato deshidrogenasa asociada con un incremento del flujo - a través del ciclo de Krebs en respuesta a los requerimientos energéticos para la gluconeogénesis. Por otra parte, la cuantificación de los niveles celulares de coenzima A libre, acetil-CoA, acil-CoA solubles (probablemente isovaleril-CoA, beta-metil-crotonil-CoA y beta-metilglutaconil-CoA) y acil-CoA insolubles parece indicar que el paso limitante en el catabolismo de los cetoácidos de cadena ramificada, cuando éstos son admi-

nistrados aisladamente, es distal al paso de deshidrogenación, aumentando al mismo tiempo la cantidad de derivados de acil-CoA de cadena larga (insolubles).

Empleando el mismo modelo experimental, se investigó la interacción de los cetoácidos de cadena ramificada con dos vías metabólicas de gran importancia en la célula hepática: la vía de la gluconeogénesis y el ciclo de la urea (Rode, et al., 1979). Se observó que el ácido alfa-ceto-isocaproico por sí solo (1 mM) prácticamente no ejerce ningún efecto sobre estas dos vías. Sin embargo, cuando se adiciona simultáneamente con alanina hay un incremento considerable (8 veces) tanto en la biosíntesis de glucosa como en la producción de urea. La adición de alfa-ceto-isocaproico, alanina, amoníaco y ornitina produce un ligero incremento tanto en la gluconeogénesis como en la síntesis de urea. Los efectos del ácido oleico fueron análogos a los del ácido alfa-ceto-isocaproico pero más intensos. Dado que este último compuesto no tiene ningún efecto sobre las mencionadas vías cuando se adiciona propionato o prolina en lugar de alanina, parecería ser que los efectos del ácido alfa-ceto-isocaproico son mediados por una actividad aumentada de la piruvato carboxilasa. Aunque la influencia de la acetil-CoA sobre la piruvato carboxilasa no es de ninguna manera el único factor regulador de la gluconeogénesis a partir de lactato o alanina, sí parece ser uno de los más importantes. En este punto es importante recordar

que la degradación del ácido alfa-ceto-isocaproico produce -- una molécula de acetil-CoA y otra de acetoacetato (ver Figura 4).

Por lo que se refiere al ácido alfa-ceto-isovalérico, consistentemente se observó una inhibición de la gluconeogénesis y de la biosíntesis de urea a partir de amoniaco. Su metabolismo está asociado con una reducción de los nucleótidos de nicotinamida mitocondriales, una caída de la coenzima A libre así como de la acetil-CoA y una acumulación de intermediarios de cadena media de acil-CoA. Por su parte, el ácido oleico invierte de manera considerable los efectos inhibitorios sobre la formación de glucosa y urea, eleva los niveles de acetil-CoA pero no impide la acumulación de los intermediarios de cadena media de acil-CoA.

El ácido alfa-ceto-beta-metilvalérico, por el contrario, tiene muy poco efecto sobre la síntesis de glucosa y urea y causa solo una pequeña caída en los niveles de acetil-CoA. Aunque los intermediarios de acil-CoA de cadena media también aumentan, lo hacen en un grado menor que con el empleo del ácido alfa-ceto-isovalérico. Parece ser que la baja velocidad de síntesis de urea inducida con este último cetoácido está asociada con una disminución del contenido tisular de -- aspartato, malato, alfaacetoglutarato y glutamato. Es obviamente muy difícil intentar explicar la compleja regulación del ciclo de la urea en función de cambios específicos de un solo

metabolismo. Sin embargo, dado que la alteración fundamental del metabolismo, inducida por la presencia de tres cetoácidos de cadena ramificada juntos consiste en una disminución del contenido hepático de acetil-CoA, podría suponerse una consecuente disminución de los niveles de oxaloacetato lo que influiría a su vez en los niveles de malato y aspartato e indirectamente en aquellos de alfa-ceto-glutarato y glutamato.

Resumiendo estas observaciones, puede decirse que los efectos más notables de los cetoácidos de cadena ramificada sobre la gluconeogénesis de los hepatocitos aislados están relacionados con la naturaleza de los productos de sus vías degradativas. En particular, los efectos inhibitorios no llegan a presentarse o lo hacen mínimamente cuando la acetil-CoA es un producto de su metabolismo como en el caso del ácido alfa-ceto-isocaproico y alfa-ceto-beta-metilvalérico. Sin embargo, estos efectos inhibitorios son más marcados en el caso del ácido alfa-ceto-isovalérico el cual sólo produce succinil-CoA. La adición de cada uno de estos cetoácidos produce una caída del contenido de la coenzima A libre y una acumulación de derivados de acil-CoA de cadena mediana y corta. De esta manera, el alfa-ceto-isocaproato produce tanto una pequeña estimulación de la gluconeogénesis como un ligero incremento de los niveles de acetil-CoA cuando lactato o alanina son adicionados como precursores gluconeogénicos. El alfa-ceto-beta-metilvalerato no tiene prácticamente ningún efecto

sobre la gluconeogénesis y tampoco altera significativamente los niveles de acetil-CoA. Por otro lado, alfa-ceto-isovalerato causa una inhibición de la gluconeogénesis a partir de lactato y una disminución significativa del contenido celular de acetil-CoA. El efecto inhibitorio parece ser, sin embargo, dependiente de sustrato, ya que no se observó ningún efecto - cuando se utilizó a la alanina como precursor gluconeogénico a pesar de que los niveles de acetil-CoA disminuyeron en un - 35% (Rode, et al., 1979). Aunque el alfa-ceto-isovalerato -- inhibe a la gluconeogénesis, sus efectos en el hepatocito ais lado requieren de una baja velocidad de oxidación de los ácidos grasos y también requiere ser metabolizado más allá del - punto de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramifica-- da para que la poza de acetil-CoA se agote. Es, por lo tanto, poco probable que los episodios hipoglicémicos de la enfermedad de orina de jarabe de arce sean debidos a una alteración de la gluconeogénesis. Ello posiblemente podría ser debido a la es timulación aumentada de la liberación de insulina por el ácido alfa-ceto-isocaproico (Rode, et al., 1979). Sin embargo, Haymond y sus asociados reportaron no haber observado en ningún momento niveles de insulina mayores de 5 micro unidades - por ml en un paciente con enfermedad de orina de jarabe de -- arce sometido a ayuno y con signos evidentes de hipoglicemia (Haymond, et al., 1973). En dicho trabajo los autores conclu yeron que la hipoglicemia parecería ser debida a un defecto - de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos la cual no pue-

de ser explicada por alteraciones de las enzimas gluconeogénicas limitantes. Más bien parecería ser que lo que ocurre es una derivación preferencial de sustratos de tres átomos de carbono provenientes de aminoácidos hacia glutamina, lo cual ocasionaría una disminución neta en la producción de oxaloacetato y gluconeogénesis deficiente (Haymond, et al., 1973).

### Variantes de la Enfermedad

En 1961, M. D. Morris y sus colegas describieron el caso de una paciente en la que, a diferencia de todos los casos reportados son anterioridad, la aparición del cuadro clínico no ocurrió a los pocos días del nacimiento sino varios meses más tarde (a los 16 meses de edad) (Morris, et al., 1961). Además como característica notable de este caso debe señalarse que la paciente sobrevivió a las manifestaciones neurológicas de la enfermedad.

Poco tiempo después, T. Rokkones y R. Kiil reportaron un caso similar en el cual la paciente, de 15 meses de edad y la segunda de dos hijos, fue admitida al hospital por un cuadro de otitis media, historia de breves convulsiones tónicas así como letargia (Kiil y Rokkones, 1964). En el momento de su hospitalización estaba semicomatosa y con un extraño olor a "curry" (en Noruega, país al que pertenece esta paciente, el jarabe de arce no se conoce). La cromatografía de orina reveló una excesiva excreción de leucina y valina. Se le dió un tratamiento a base de soluciones electrolíticas y glucosa así

como antibi<sup>o</sup>ticoterapia con lo que pudo ser dada de alta satisfactoriamente. Su desarrollo tanto físico como mental ha sido, y continúa siendo, completamente satisfactorio.

Utilizando leucocitos intactos así como aminoácidos de cadena ramificada marcados radioactivamente en el grupo carboxilo ( $^{14}\text{C}$ ), Dancis cuantificó la actividad de la deshidrogenasa en los pacientes mencionados así como en los hermanos -- afectados encontrando una actividad enzimática reducida aunque no a niveles tan bajos como en aquellos casos con un cuadro -- "clásico" de enfermedad de orina de jarabe de arce.

En virtud de que en esta variedad de la enfermedad - el cuadro clínico sólo se presenta asociado con cualquier tipo de estrés (fundamentalmente infecciones) que afecte al paciente, encontrándose clínicamente normal entre estos episodios, a este tipo de variedad de la enfermedad de orina de jarabe de arce se le conoce como "intermitente".

Más adelante, J. D. Schulman y sus asociados reportaron el caso de una paciente de 20 meses de edad y con un considerable retraso mental, hija de padres no emparentados entre sí. Además, al ser hospitalizada para estudiar su retraso sicomotor, se apreció el olor característico a jarabe de arce de su sudor y orina y su madre afirmó haber notado dicho olor desde los primeros días del nacimiento de la paciente (Schulman, et al., 1970). Sin embargo, nunca presentó episodios neuroló-

gicos de ninguna naturaleza (convulsiones, ataxia, vómitos repetitivos, etc.), ni siquiera cuando sufrió una neumonía estafilocócica. A través de la cromatografía en papel pudo demostrarse una marcada elevación de leucina, isoleucina y valina - en el plasma de la paciente. Los estudios de actividad enzimática tanto en leucocitos como en fibroblastos intactos empleando aminoácidos radioactivos nuevamente mostraron una considerable disminución de actividad con respecto a controles normales pero, interesantemente, no tan baja como en el caso de los pacientes con la forma clásica de la enfermedad. En función de estos hallazgos, Schulman y sus colaboradores denominaron a esta nueva variedad como "intermedia".

La diferencia fundamental entre esta variedad y la intermitente radica básicamente en la presencia constante de cantidades aumentadas de los aminoácidos y cetoácidos de cadena ramificada en la sangre y orina de los pacientes con la variedad intermedia así como un considerable grado de retraso mental.

Posteriormente, Charles Scriver y sus asociados de la Universidad de McGill, Canada, reportaron el caso de una paciente de 11 meses de edad que presentaba como única manifestación clínica, retraso mental (a esa edad, su coeficiente intelectual correspondía al de un niño de 4 meses de edad) (Scriver, et al., 1971). La cromatografía de una muestra de su ori

na reveló la presencia en exceso de los tres aminoácidos de ca  
dena ramificada. Además, tanto esta muestra como las subse---  
cuentes mostraron el característico olor a jarabe de arce. La  
concentración plasmática de leucina, isoleucina y valina fue -  
unas 5 veces mayor que lo normal. En función de lo benigno -  
del cuadro clínico y de la naturaleza de las anormalidades bio  
químicas se pensó que este caso correspondería a alguna varie-  
dad diferente de la clásica. Por esta razón, se prescribió a  
la paciente la ingesta diaria de 10 mg (20 veces lo normal) de  
hidrocloruro de tiamina, con la esperanza de que este caso se  
comportara como una dependencia vitamínica (como se recordará,  
esta vitamina es el precursor de la coenzima de la fracción de  
la decarboxilasa, pirofosfato de tiamina).

Bajo este tratamiento, las concentraciones plasmáti-  
cas de los tres aminoácidos disminuyeron abruptamente. Al sus-  
penderse la administración de tiamina los niveles de los amino  
ácidos mencionados nuevamente se elevaron para volver a descen-  
der al reiniciarse el tratamiento vitamínico. No fue necesario  
en ningún momento complementar dicho tratamiento con una dieta  
libre o baja en contenido de aminoácidos de cadena ramificada.  
Por todo ello, a esta nueva variedad se le denominó "enferme--  
dad de orina de jarabe de arce con respuesta a la tiamina".

Elsas y sus asociados han investigado el posible mo-  
do de acción de la tiamina sobre la deshidrogenasa de cetoáci-

dos de cadena ramificada de individuos normales y enfermos, -- tanto in vivo como in vitro (Elsas, et al., 1976). Observa-- ron que después de tres semanas de administración de 150 mg de tiamina aumentó la utilización in vivo de los aminoácidos de -- cadena ramificada tanto en los controles como en los pacientes con enfermedad de orina de jarabe de arce. Dado que la tiami-- na no aumentó directamente la cantidad de deshidrogenasa hepá-- tica ni de fibroblastos, parecería ser que su efecto es a tra-- vés de una estabilización de la enzima con un consecuente in-- cremento en su vida media biológica (Elsas, et al., 1976).

Además de las cuatro variedades arriba resumidas -- (clásica, intermitente, intermedia y tratable con tiamina) en los últimos años se han reportado dos variedades más. En una de ellas, reportada por R. A. Harkness y sus colaboradores, -- se observó una actividad enzimática prácticamente normal en -- las células amnióticas y leucocitos de un paciente recién naci-- do y quién, a pesar del tratamiento dietético iniciado a los -- pocos días de su nacimiento, mostró concentraciones plasmáti-- cas de los aminoácidos de cadena ramificada sumamente elevadas así como de los respectivos cetoácidos. No se observó ninguna respuesta al tratamiento con altas dosis de tiamina. Dado que no se encontró evidencia del defecto enzimático clásico, fueron investigados otros pasos metabólicos que pudiesen estar invo-- lucrados. El sistema de transporte celular para leucina y fe-- nilalanina en los eritrocitos fue completamente normal al igual

que la transaminación de los tres aminoácidos ramificados --  
(Harkness, et al., 1977).

Aunque no se ha podido llegar todavía a una respuesta razonable para la interrogante de esta variedad, una hipótesis interesante es aquella que supone que el defecto enzimático solo estaría confinado a ciertos tejidos metabólicamente activos (como hígado y riñón) y no es aparente a nivel de leucocitos, fibroblastos y células amnióticas.

Finalmente, S. M. Pueschel y su grupo reportaron en 1979 el caso de un nipo de 4 años de edad que por su historia clínica podía ser considerado como afectado por la variedad intermitente de la enfermedad. Sin embargo, este paciente -- mostró una respuesta considerablemente más satisfactoria al tratamiento dietético cuando éste se acompañó de la administración de tiamina (Pueschel, et al., 1979).

En un esfuerzo por lograr una clasificación más lógica de las diferentes variedades de la enfermedad de orina de jarabe de arce (clásica, intermedia, intermitente, etc.) -- Dancis ha agrupado a estas diferentes variantes en 3 grados -- de acuerdo a la severidad y momento de aparición del cuadro clínico; a la tolerancia a la ingesta de proteínas y a la proporción de actividad enzimática residual observada en leucocitos o fibroblastos en cultivo (Dancis y Levitz, 1978). De -- acuerdo a esta clasificación, los tres grados se caracteriza-

rían de la siguiente manera:

Grado 1. En este caso, la tolerancia a la ingesta de aminoácidos de cadena ramificada por arriba de los requerimientos para el mantenimiento y crecimiento es extremadamente limitada. Además, los signos y síntomas clínicos aparecen en una época muy temprana de la vida y, en ausencia de tratamiento, toman un curso rápidamente progresivo y habitualmente fatal. La actividad enzimática de los fibroblastos oscila entre niveles de 0 y 2% de los varlos normales. A este grado correspondería la variedad denominada "clásica".

Grado 2. Este tipo de pacientes tolera una ingesta proteica entre 1.5 y 2.0 g por kg de peso corporal, lo que frecuentemente es suficiente para satisfacer los requerimientos de aminoácidos para el crecimiento y desarrollo. El cuadro clínico muchas veces aparece tardíamente (v.g. cuando se introduce leche de vaca a la dieta) y es mucho más benigno que en el caso anterior. Sin embargo, ello puede ocasionar que escape a la atención del médico y llega finalmente a producir serios trastornos sicomotores. La actividad enzimática de los fibroblastos de este tipo de pacientes oscila entre un 2.0 y un 8.0% de los

valores normales. La variedad intermedia se considera actualmente como equivalente a este grado.

Grado 3. Los individuos considerados en este grado tienen una amplia tolerancia a la ingesta proteica. Habitualmente, el cuadro clínico solo se manifiesta durante ataques agudos de estrés, particularmente infecciones, aunque en ocasiones llega a presentarse sin una causa aparente. Durante esos episodios, el paciente se observa irritable; anoréxico, con ataxia y con el característico olor a jarabe de arce. Ocasionalmente, el cuadro puede progresar a convulsiones, coma y muerte. La actividad enzimática de estos pacientes oscila entre un 8.0 y un 15% de los valores normales. La variedad originalmente denominada intermitente quedaría considerada dentro de este grado.

Aunque dentro de esta clasificación Dancis no hace ninguna consideración con respecto a aquellas variedades que han respondido a un tratamiento con tiamina, puede afirmarse que en base a la historia clínica y a las mediciones de actividad enzimática, se tendrían casos grado 2 ó 3 que respondan a la mencionada vitamina tales como los considerados líneas arriba. Aunque todavía no ha sido descrito ningún paciente con -

una actividad enzimática entre 0 y 2% con respecto a los controles normales y que responda a un tratamiento con tiamina, - ello es, al menos en teoría, perfectamente posible.

### Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad al momento del nacimiento es muy difícil ya que el producto estuvo protegido durante toda la gestación por el metabolismo materno. De esta manera, durante los días inmediatos al nacimiento los niveles plasmáticos de los aminoácidos de cadena ramificada si bien -- van en aumento, todavía se encontrarán dentro de límites normales. Al final de la primera semana, sin embargo, la acumulación tanto de los aminoácidos como de sus respectivos cetoácidos en plasma y orina será lo suficientemente elevada como para calificarla de anormal. La rápida determinación de estos metabolitos en los líquidos fisiológicos es posible mediante el -- empleo de varios tipos de cromatografía (en papel, en capa fina, por intercambio iónico), o bien la prueba de Guthrie para leucina. La confirmación definitiva del diagnóstico solo podrá hacerse en base a la medición de la actividad enzimática -- involucrada, en leucocitos o en fibroblastos en cultivo.

Como ya se mencionó al principio de este capítulo, - de no instituirse una terapéutica adecuada el paciente presentará rápidamente un cuadro progresivo y severo de deterioro -- sicomotor totalmente inespecífico. El único signo que podría

76

considerarse como patognomónico de esta enfermedad es el del olor a jarabe de arce de la orina del paciente. Sin embargo, el diagnóstico deberá de ser confirmado mediante la determinación de los aminoácidos ramificados en plasma ya que, curiosamente, se han reportado dos casos en los que la orina de los niños presentó temporalmente el olor característico aunque los exámenes de laboratorio excluyeron el diagnóstico -- (Dancis y Levitz, 1978).

### Tratamiento

Los principios del tratamiento de la enfermedad de orina de jarabe de arce son, en teoría, bastante simples. -- Una vez que el diagnóstico ha sido establecido, el paciente es sometido a una dieta de aminoácidos en la que los de cadena ramificada son omitidos y a la que se agregan los suplementos necesarios de carbohidratos, grasa, vitaminas y sales minerales. Una vez que los niveles plasmáticos de los aminoácidos de cadena ramificada han descendido a valores normales, dichos aminoácidos se reincorporan a la dieta en cantidades suficientes para satisfacer, pero no sobrepasar, los requerimientos de los mismos. Los requerimientos de los aminoácidos restantes son satisfechos con el empleo de mezclas de aminoácidos puros y de alimentos naturales apropiados. -- Esto último es necesario ya que de esta manera puede llegar a evitarse la omisión de componentes dietéticos todavía no identificados como esenciales.

77

Sin embargo, el tratamiento arriba señalado es bastante más complejo. Las principales razones de dicha complejidad son:

1. Son tres y no solamente uno los aminoácidos involucrados en este problema y los requerimientos de cada uno de ellos deberá de ser determinado de manera individual, lo que requiere de una cuidadosa supervisión de laboratorio.
2. Relacionado con el punto anterior, es necesario señalar que no existen métodos sencillos para la determinación de estos aminoácidos. En la actualidad, el método más confiable con el que se cuenta es el de la cromatografía automatizada de intercambio iónico. Puede usarse también el ensayo de inhibición microbiológica de Guthrie para semicuantificar a la leucina aunque no es tan preciso como el método cromatográfico.

Independientemente del método utilizado, al principio del tratamiento las cuantificaciones de los aminoácidos plasmáticos deberán de hacerse diariamente ya que es sumamente crítico tanto el exceso como la deficiencia de estos aminoácidos. La insuficiencia de los mismos puede fácilmente llegar a interferir con el crecimiento del paciente y, en algunos casos, lle

var a la autodegradación de la proteína tisular con una paradójica elevación secundaria de los aminoácidos ramificados.

3. Relacionado también con el punto 1 está el hecho de que la mayoría de los alimentos tienen un contenido elevado de los aminoácidos de cadena ramificada por lo que la dieta deberá basarse frecuentemente en el uso de aminoácidos purificados.
4. Con relativa frecuencia ocurren recaídas, aún en pacientes bien controlados, especialmente durante los primeros meses de la vida. Estas recaídas, asociadas a diversos estados de estrés, pueden llegar a ser muy serias e incluso poner en peligro la vida del paciente. Habitualmente son precedidas por manifestaciones de anorexia, olor a jarabe de arce y episodios de ataxia seguidos de letargia y convulsiones. El principal factor desencadenante de estos ataques muy probablemente sea un catabolismo aumentado de las proteínas corporales con un alto contenido de aminoácidos de cadena ramificada y acumulación aguda de los respectivos cetoácidos.

No existe todavía ninguna indicación sobre cuando podrá llegar a interrumpirse el tratamiento dietético en estos pacientes. Sin embargo, la experiencia ganada con niños

afectados de diversas variantes de la enfermedad indican que aún en edades tan relativamente tardías como los 8 años, una elevación aguda de los niveles plasmáticos de aminoácidos de cadena ramificada puede llevar a un desenlace fatal. Es por ello que para evitar cualquier problema, el tratamiento de este tipo de pacientes deberá realizarse preferencialmente en aquellos sitios que cuenten con el personal e instrumentación adecuada para la cuantificación rápida y frecuente de los -- aminoácidos plasmáticos con el fin de estar en posibilidad de indicar rápidamente cambios dietéticos, administración de -- fluidos y electrolitos y, en casos necesarios, exsanguíneo-- transfusiones y diálisis peritoneal.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

Estudios Diagnósticos

Cromatografía bidimensional ascendente para aminoácidos urinarios (Shaw, et al., 1971).

Papel Whatman No. 1 (Whatman Ltd.), en hojas de 20 x 20 cms  
Cuba rectangular Pyrex de 12 pulgadas por lado (Corning - Glass Co.) para cromatografía.

Sistema de solventes para la primera dimensión:

Piridina (merck)	45.0%
Acetona (Baker Analyzed)	30.0%
Amoniaco (Baker Analyzed)	12.5%
Agua bidestilada	12.5%

Sistema de solventes para la segunda dimensión:

2-propanol (Baker Analyzed)	80.0%
Acido fórmico al 89% (Baker Analyzed)	10.0%
Agua bidestilada	10.0%

Solución para el revelado del cromatograma:

Ninhidrina (Merck)	2.5 g
Isatina (Merck)	50.0 mg
2,4-lutidina (Merck)	10.0 ml
Acetona (Baker Analyzed)	1000.0 ml

Procedimiento: La cromatografía bidimensional ascendente para aminoácidos es realizada bajo el principio general

de emplear volúmenes de orina equivalentes a 25 microgramos - de creatinina o bien, 100 microlitros de ultrafiltrado sérico (Shaw, et al., 1971). Dichas alícuotas se aplican a 2 cm de una de las esquinas del papel filtro cuidando que el área humedecida no se expanda demasiado. Para tal efecto puede emplearse, a intervalos, una pistola de aire caliente. Es necesario señalar la gran importancia de utilizar durante todas - estas manipulaciones del papel, guantes desechables con el objeto de no impregnarlo con aminoácidos digitales. Los papeles filtro conteniendo la muestra son colocados en marcos apropiados de aluminio anodizado de 20 x 20 x 25.5 cm y separados entre sí por rondanas del mismo material. A su vez, el marco con los papeles se coloca sobre una charola de aluminio anodizado o acero inoxidable de 28 x 28 x 5.1 cm que contenga -- 250 ml del sistema de solventes deseado. Finalmente, la charola, junto con el marco que soporta a los papeles, se coloca - en la cuba de cromatografía. El tiempo de la corrida es de - 16 horas.

Al término de la corrida se deja secar a los cromatogramas por lo menos durante 1 hora a temperatura ambiente. - Para visualizar a los aminoácidos se sumerge uniformemente el cromatograma en una charola con la solución reveladora y se -- deja que seque en un sitio protegido de la luz solar directa. Las manchas comienzan a aparecer unos 15 minutos más tarde y - la inspección óptima se realiza entre las 2 y 3 horas poste---

riores al revelado, mediante el auxilio de un negatoscopio.

Cromatografía unidimensional descendente para aminoácidos plasmáticos (Shaw, et al., 1971).

Papel Whatman No. 3 (Whatman, Ltd.), en hojas de 57 x 17.5 cm.

Cuba cilíndrica Pyrex de 12 x 24 pulgadas (Corning Glass, Co.) para cromatografía.

Sistema de solventes:

Butanol (Baker Analyzed)	12.0 volúmenes
Acido Acético (Baker Analyzed)	3.0 volúmenes
Agua bidestilada	5.0 volúmenes

Solución estándar: contiene los siguientes aminoácidos a una concentración de 10.0 mg%: leucina, metionina, tirosina, alanina, ácido glutámico, glicina, homocistina, ácido argininosuccínico, cistina, cistidina, histidina, cistationina, fenilalanina y glutamina. Contiene además prolina, a una concentración de 20.0 mg%. Todos los aminoácidos fueron adquiridos de Calbiochem.

Procedimiento: Manejando el papel filtro con el cu dado ya señalado, se aplican 5.0 microlitros de suero en cada uno de los 6 canales laterales (3 a cada lado del séptimo canal, el central). Se colocan 10.0 microlitros de la solución del estándar en el canal central y una vez que las aplicaciones han secado, se acomoda el cromatograma en las canastillas del solvente. El tiempo de la corrida es de aproximadamente 18 a 20 horas. El revelado se realiza de una manera análoga al de los cromatogramas bidimensionales empleando la solución

83

ninhidrina.

Cromatografía en capa fina para dinitrofenilhidrazonas en orina (Thomas y Howell, 1973).

Hojas de silica gel (Merck, de 20 x 20 cm, cortadas con tijeras a 10 x 10 cm.

Cuba chica Pyrex (Corning Glass, Co.) para cromatografía.

Sistema de solventes:

Alcohol isoamílico (Baker Analyzed)	95.0%
Hidróxido de amonio 0.25 N (Baker Analyzed)	5.0%

2,4-dinitrofenilhidrazina, 0.28%:

2,4-dinitrofenilhidrazina (Merck)	0.7 g
Acido clorhídrico 1 N	250.0 ml

Mezcla de extracción cloroformo-etanol:

Etanol (Baker Analyzed)	100.0 ml
Cloroformo (Baker Analyzed)	400.0 ml

Procedimiento: A una cantidad de orina equivalente a 0.4 mg de creatinina se le agregan 2.0 ml de la solución de dinitrofenilhidrazina, mezclándose bien. Unos 30 minutos después se transfiere la mezcla a un embudo de separación y se extraen las hidrazonas formadas, con tres porciones de 15.0 ml cada una de la mezcla de cloroformo-etanol. Se descarta la orina y se juntan las tres porciones de extracción. De esta mezcla se extraen las hidrazonas con 15.0 ml de una solución de carbonato de sodio al 10.0%. Se descarta la mezcla de clo-

roformo-etanol y se conserva la de carbonato de sodio, la cual se "lava" con 10.0 ml de cloroformo-etanol y posteriormente se acidifica a pH 2-3 por adición de unos 5.0 ml de HCl 5 N. Se vuelve a reextraer la solución acidificada con cantidades sucesivas de 10.0, 5.0 y 5.0 ml de la solución de cloroformo-etanol, la cual se conserva ya que contiene los derivados de los cetoácidos. Se agrega una pequeña cantidad de sulfato de amonio anhidro y se filtra, conservándose el filtrado claro el cual se evapora a sequedad con un flujo suave de aire. Finalmente, se disuelve el precipitado en un volumen final de 0.5 ml de etanol.

De la solución final se aplican 5.0 microlitros en la placa de sílica-gel, a 2.0 cm del borde de la misma y una vez que ha secado se coloca en la cuba de cromatografía dejando correr a los solventes de 4 a 6 horas. Al finalizar la corrida se deja que seque la placa a la temperatura ambiente en una atmósfera de aire seco. El complejo alfa-cetoácido-2,4-dinitrofenilhidrazona se localiza fácilmente por la aparición espontánea del color amarillo que le es característico.

Prueba cualitativa de dinitrofenilhidrazina para compuestos ceto (Thomas y Howell, 1973).

Reactivo de dinitrofenilhidrazina:

2,4-dinitrofenilhidrazina (Merck)	0.7 g
Acido clorhídrico 1 N (Baker Analyzed)	
	250.0 ml

Procedimiento: Se filtra la orina y a 1.0 ml de este filtrado se le agrega 1.0 ml del reactivo de dinitrofenilhidrazina. Inmediatamente después de haber agregado el reactivo, la solución se ve clara, de color amarillo-anaranjado pálido el cual persistirá si la prueba es negativa. La prueba se considera positiva cuando se forma una turbidez o precipitado amarillento o amarillento-blanquecino unos 5 minutos después de haber agregado el reactivo de dinitrofenilhidrazina.

Determinación de aminoácidos plasmáticos por cromatografía automatizada de intercambio iónico.

La muestra de sangre obtenida para determinación de aminoácidos es centrifugada a unas 3,000 rpm en una centrífuga clínica con el objeto de separar el plasma. A éste último se le agrega un volumen igual de una solución del estándar interno (nor-leucina disuelta en cloruro de litio 0.48 N, pH 0.9, a una concentración de 3 microgramos por ml.). A continuación, el plasma es desproteínizado por ultrafiltración y de este ultrafiltrado se toman de 0.2 a 0.5 ml para ser inyectados en un autoanalizador de aminoácidos Technicon con columna de intercambio iónico.

Cuantificación de leucina por el método de inhibición microbiológica de Guthrie (Shih, 1973).

Papel filtro Schleicher y Schuell No. 903 (Scientific Products).

Perforador para papel de 1/8 de pulgada de diámetro

Charolas de plástico estireno de 17.8 x 28 cm con cubierta.

Estufa de incubación a 37°C

Medio mínimo de cultivo de Demain modificado, constituido por:

Dextrosa		10.0 g/l
H <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		30.0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		10.0 g/l
NH <sub>4</sub> Cl		5.0 g/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		1.0 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1.0 g/l
Acido glutámico		1.0 g/l
Asparagina		1.0 g/l
L-alanina		1.0 g/l
Solución salina		10.0 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	60.0 g	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.0 g	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.0 g	
CaCl <sub>2</sub>	0.5 g	
Aforar ya	1000.0 ml	

B. subtiles ATCC 6051

Inhibidor: 4-azaleucina

Procedimiento: Preparación del medio de cultivo: --

La dextrosa se prepara como una solución al 10.0% y se esteriliza por separado. El resto de los componentes se disuelven en 900.0 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8 - 7.0. - La solución se coloca en botellas de tamaño adecuado y se este

riliza en autoclave. Antes de usarse, 9 partes de la solución se mezclan con 1 parte de la solución de dextrosa.

Preparación del inhibidor: A una concentración de  $6.7 \times 10^{-5}$  M de 4-azaleucina, se obtiene una zona de crecimiento óptimo en el rango de 1.0 a 10.0 mg/100 ml de leucina, siendo la concentración plasmática normal de este aminoácido de 2.0 a 4.0 mg/100 ml. La solución del inhibidor es preparada de tal manera que se necesite menos de 0.5 ml de dicha solución para alcanzar la concentración arriba mencionada por charola. La cantidad óptima de inhibidor podrá variar en función de las diferentes cepas de B. subtilis.

Preparación del inóculo: Las esporas de B. subtilis, cepa ATCC 6051 son distribuidas comercialmente por Ames Co., Elkhart, Ind. en viales de 10.0 ml. A partir de dicha preparación se hace una dilución de 1 en 5 con medio de Demain y se utiliza una décima de mililitro por charola.

Preparación de la charola de prueba: Se disuelven 30.0 g de agar en 1000.0 ml de agua destilada colocada en baño maría con agua hirviendo. Una vez que el agar se ha disuelto completamente, se deja enfriar hasta 50-55°C. Al alcanzarse esta temperatura se agregan el inhibidor, el inóculo (el cual también está a la misma temperatura) y un volumen igual de medio de Demain, mezclándose de manera homogénea. De esta mez-

88

cia se colocan 150.0 ml en cada charola de plástico de 17.8 x 28.0 cm con lo que se obtiene una capa de medio de cultivo de grosor apropiado. Las charolas pueden reusarse sin necesidad de ser esterilizadas.

Preparación de los especímenes de control: Puede -- utilizarse sangre descartada por un banco de sangre en función de su fecha de vencimiento. Se cuantifica en un analizador de aminoácidos su contenido de leucina y a diferentes alícuotas - se le agrega la cantidad necesaria de leucina para obtener con concentraciones de 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 20.0 mg/100 ml. -- De estas alícuotas se aplican muestras al papel filtro S.S. -- 903 para formar manchas de 3/8 a 1/2 pulgada de diámetro. Una vez que han secado a temperatura ambiente, las hojas pueden -- guardarse a 4°C en desecación. Antes de su uso deberán de ser autoclaveadas al igual que el papel filtro problema.

Preparación de la muestra problema: En hojas de papel filtro S.S. 903 se colocan gotas de sangre del paciente -- procurando que alcancen un diámetro de por lo menos 1 cm (3/8 de pulgada). Después de que han secado, se coloca a los papeles filtro en autoclave por 3 minutos antes de ser utilizados para la cuantificación.

Procedimiento para la cuantificación del aminoácido: Una vez que el agar se ha endurecido, se colocan las muestras problema (en forma de discos de papel filtro con sangre de --

unos 3.0 mm de diámetro-1/8 de pulgada-), separadas entre sí por 2.5 cm. En la hilera intermedia se coloca una serie de -- discos controles. De esta manera, cada charola puede acomodar un total de 72 discos en 6 hileras de 12 discos cada una. La charola se incuba a 37°C durante la noche.

Para la interpretación se examina la charola en busca de la presencia de halos de crecimiento de B. subtilis alrededor de los discos problema. Para semicuantificar a la leucina presente en la sangre del paciente, se compara el diámetro del halo alrededor del disco problema con los halos de los discos controles.

Con esta prueba, valores de más de 4 mg/100 ml de -- leucina se consideran anormales.

#### Cultivo de Tejidos

Medio de cultivo: medio mínimo de Eagle (modificado) con 12% de suero bovino fetal.

MEM en pulvo (NABI)	9.8 g/l
NaHCO <sub>3</sub> (Mallinckrodt)	2.2 g/l
Piruvato de sodio, 200 mM (Calbiochem)	5.0 ml
Nucleósidos sin guanosina, 100X (Calbiochem)	10.0 ml
Guanosina, 33X (Calbiochem)	30.0 ml
Acido ascórbico, 1% (Merck)	0.5 ml
Suero bovino fetal (Microbiological Associates)	120.0 ml
Agua bidestilada	835.0 ml

Procedimiento: En un matraz de Erlenmeyer se coloca el agua bidestilada a la que se agregan cada uno de los -- componentes arriba mencionados (excepto el bicarbonato de sodio, el cual se agrega hasta el final para facilitar su disolución), manejando esterilmente al piruvato de sodio, nucleósidos, guanosina, ácido ascórbico y suero bovino fetal. Se agita la mezcla empleando una barra magnética y se le adiciona, por último, el bicarbonato de sodio. Se ajusta el pH a aproximadamente 7.2 y se esteriliza por filtración a presión en un filtro Millipore de 0.22 micras. Se conserva en refrigeración bajo condiciones estériles.

Piruvato de sodio, 200 mM:

Piruvato de sodio (Calbiochem)	2.2 g
Agua Bidestilada	200.0 ml

Nucleósidos sin guanosina:

Adenosina (Calbiochem)	1.5 g
Timidina (Calbiochem)	1.5 g
Citidina (Calbiochem)	1.5 g
Uridina (Calbiochem)	1.5 g
Agua bidestilada	1000.0 ml

Guanosina, 33X:

Guanosina (Calbiochem)	0.5674 g
Agua bidestilada	1000.0 ml

Acido ascórbico, 1.0%

Acido ascórbico (Merck)	1.0 g
Agua bidestilada	100.0 ml

Antibióticos de Eagle:

Penicilina G potásica (Squibb)	1.106 U.I.
Estreptomina (Squibb)	1.2 g
Aureomicina (Cynamid)	0.025 g
Agua bidestilada	100.0 ml

Preparación: Todas las soluciones se preparan por separado agregando en un matraz Erlenmeyer, al volumen de agua indicado, la cantidad necesaria de la sustancia sólida. Las soluciones se esterilizan por filtrado a través de un filtro de 0.22 micras (Millipore). Se conservan en refrigeración excepto el ácido ascórbico y los antibióticos, los cuales se guardan en congelación y se protegen de la luz envolviendo al recipiente con papel aluminio.

Solución de verseno:

EDTA (Sigma de México)	1.0 g
NaCl (Mallinckrodt)	4.0 g
KCl (Mallinckrodt)	2.0 g
Tris-base (Sigma de México)	1.5 g
Rojo de Fenol, 1.0% (Merck)	0.5 ml
Agua bidestilada	500.0 ml

Solución de tripsina:

Tripsina (Merck)	0.63 g
Solución de verseno	250.0 ml

Preparación: En un matraz de Erlenmeyer se prepara la solución de verseno mezclando los componentes arriba indicados. Una vez preparada, se toman 250.0 ml y en ella se disuelve a la tripsina. En ambas soluciones se ajusta el pH a 7.8. Se esterilizan por filtrado a presión a través de un filtro --

Millipore de 0.22 micras, filtrándose primero el verseno y luego la tripsina. Se conservan en refrigeración.

Frascos de cultivo:

Botella T-25 (Falcon Plastics)  
Botella T-75 (Falcon Plastics)  
Cajas de Petri de 9.0 cm de diámetro

Células

Fibroblastos en cultivo: Los fibroblastos cultivados del paciente, de su padre y de su madre fueron obtenidos a partir de un explante de piel y tejido celular subcutáneo tomado de la región del músculo deltoides (realizado en el Hospital -- del Niño, Instituto Nacional de Pediatría, D.I.F.). Previa infiltración de la región con xilocaína al 1% se realizó asepsia y antisepsia con benzal, solución salina estéril y alcohol. Se practicó incisión de la piel y tejido celular subcutáneo con un perforador circular cutáneo de 5.0 mm de diámetro. Los fragmentos así obtenidos fueron colocados en un tubo de ensaye de rosca, estéril, conteniendo 25.0 ml de medio de cultivo al que se le habían adicionado antibióticos al 1%. A partir de este momento, dichos fragmentos se manejaron siempre en forma estéril. Entre 1 y 2 horas más tarde, en el laboratorio de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., los fragmentos de tejido fueron colocados en cajas de Petri dentro de una campana de flujo laminar y cortados en fragmentos más -- pequeños (de unos 2.0 mm de longitud) mediante el empleo de pin

zas de disección y tijeras de cutícula. A su vez, estos pequeños fragmentos se colocaron en botellas de cultivo T-25, cinco fragmentos por botella, y se adicionó la cantidad suficiente, - de medio para cubrirlos totalmente pero sin que llegaran a flotar. Se incubaron a 37°C.

Aproximadamente de tres a cuatro semanas después de haberse realizado el explante, se pudo apreciar, alrededor de cada fragmento, una gran cantidad de fibroblastos y, ocasionalmente, células epitelioides. A partir de este momento, el medio de cultivo, ya sin antibióticos, comenzó a cambiarse cada tercer día. Una o dos semanas más tarde, mediante el empleo de las soluciones de verseno y tripsina, las células fueron despegadas y transferidas a botellas T-75. Al llegar estas células a confluencia fueron subcultivadas a nuevas botellas T-75 con el objeto de expandir a las líneas celulares. Una vez logrado esto, aquellas células que no fueran a ser utilizadas para experimentación fueron congeladas en nitrógeno líquido con el fin de evitar sus senescencia. Ninguna de las células utilizadas para experimentación sufrió más de 15 subcultivos. La línea celular derivada del paciente se denominó AFA; la del padre del paciente PAF y la de la madre del paciente MAF.

Las líneas celulares normales utilizadas como controles fueron obtenidas a partir de prepucios de niños recién nacidos, sanos, en el Hospital Santa Teresa. Dichos prepucios fueron manejados de una manera análoga a la de los fragmentos dé-

micos mencionados líneas arriba.

Fracción enriquecida de plaquetas: algunos experimentos se realizaron con homogenados de preparados celulares enriquecidos con plaquetas, obtenidos a partir de sangre total, según la técnica de Blass y asociados (Blass, et al., 1977). Se tomó por lo general 15 ml de sangre venosa y se mezcló inmediatamente con 0.2 volúmenes (3.0 ml) de una solución salina-Dextrán (Dextran, Sigma Chemical Co. (P. M. 170,000), 5.0%; cloruro de sodio, 0.7%; EDTA, 1.5%; pH 7.4) en la misma jeringa y se dejó reposar en baño de hielo durante 60 minutos con lo que los glóbulos rojos sedimentaron sobre el émbolo de la jeringa. Al finalizar los 60 minutos, se dobló cuidadosamente la aguja de la jeringa hasta formar un ángulo de 60° y se impelió a través de ella el plasma hacia dos tubos de plástico de centrifuga. El plasma se centrifugó por 10 minutos a 3100Xg y 4°C, con lo que se obtuvo un precipitado rojizo. El sobrenadante se descartó y se agregaron 3.0 ml de agua fría bidestilada durante 30 segundos al tiempo que se colocaba al tubo en un vórtex con el fin de resuspender el botón celular. La isotonicidad se reestableció agregando 1.0 ml de una solución de cloruro de sodio al 3.6% y mezclando rápidamente en el vórtex. Se volvió a centrifugar a 3100Xg y el botón celular obtenidos se lavó con 5.0 ml de solución salina amortiguadora, "PBS" (Dulbecco y Vogt, 1954) pH 7.4 (NaCl, 8.0 g; KCl, 0.2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 1.5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g; H<sub>2</sub>O, aforar a 1000 ml). Este lavado se efectuó un total de tres veces. Después de la última

centrifugación y antes de resuspender a las células, el tubo de centrífuga que las contenía fue sumergido en hielo seco-acetona con el objeto de romper a las células. Posteriormente, dicho homogenado celular fue resuspendido en una solución amortiguadora de Tris-HCl-EDTA (Tris-HCl, 50.0 mM; EDTA, 0.2 mM; pH 7.5). La concentración final de proteína nunca fue menor a 2.0 microgramos por microlitro. De esta resuspensión se tomó el volumen necesario para constituir la mezcla de reacción según se indica en el procedimiento para el ensayo enzimático.

### Estudios de Enzimología

Determinación de proteína por el método de Lowry modificado (Oyama & Eagle, 1956).

#### Solución A

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (J.T. Baker)	20.0 g
NaOH (J.T. Baker)	4.0 g
Tartrato de sodio y potasio (J.T. Baker)	0.2 g
Aforar a	1000.0 ml

#### Solución B

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (J.T. Baker)	5.0 g
Aforar a	1000.0 ml

#### Solución C

Solución A	50.0 volúmenes
Solución B	1.0 volumen

#### Reactivo de Folin-Ciocalteu

Reactivo	5.0 ml
Agua bidestilada	9.0 ml

96

Procedimiento: Se realiza por triplicado. A los tubos "blanco" se les coloca 1.0 ml de agua bidestilada. A los tubos con estándares se les coloca 1.0 ml de agua bidestilada conteniendo 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 y 60.0 microgramos de albúmina bovina. En los tubos "problema" se coloca una cantidad aproximada de proteína equivalente a 30.0 - 60.0 microgramos en 1.0 ml de agua bidestilada. A continuación, se colocan en cada uno de los tubos 5.0 ml de la solución "C". Posteriormente, con jeringa Cornwall se colocan rápidamente 0.5 ml del reactivo de Folin, mezclando en un vórtex. La lectura colorimétrica puede efectuarse entre 30 y 120 minutos más tarde, ajustando el colorímetro a 660 nanómetros de longitud de onda. La cantidad de proteína en el problema se calcula a partir de la curva estándar.

Preparación del ácido alfa-ceto-isovalérico (Rüdiger, et al., 1972).

L-valina-1-<sup>14</sup>C (New England Nuclear)  
L-amino oxidasa (Worthington Biochemical Corp.)  
Catalasa (Worthington Biochemical Corp.)  
Resina Dowex 50 W (Sigma Chemical Co.)  
Amortiguador Tris-HCl 1 M (Sigma Chemical Co.)  
Placas de sílica-gel (Merck)

Procedimiento: Se liofilizan directamente en su envase original 50.0 micro Curies de valina-1-<sup>14</sup>C con una actividad específica aproximada de 50.0 mC/milimola. El polvo resultante es transferido a un matraz de Erlenmeyer de 10.0 ml

de capacidad utilizando dos porciones de 500.0 microlitros cada una, de agua destilada. A continuación se agregan 500.0 -- microlitros del amortiguador Tris-HCl 1 M, pH 7.7; 50.0 microlitros de una solución de catalasa a una concentración de --- 8.8 mg/ml y 200.0 microlitros de la solución de la L-amino oxidasa, precisamente en el orden mencionado. Realizada la mez-- cla se gasea el matraz con O<sub>2</sub>, 3.0 litros por minuto, durante 1 minuto al final del cual se tapa herméticamente a dicho ma-- traz con un tapón reversible de hule. La mezcla se incuba en un agitador metabólico Dubnoff a 37°C, con agitación continua y por espacio de 3 horas. Al finalizar los primeros 60 minu-- tos de incubación se vuelve a gasear el matraz con O<sub>2</sub>.

La separación del ácido alfa-ceto-isovalérico del aminino-ácido residual se realizó haciendo pasar a toda la mezcla - de incubación a través de una columna de 10.0 x 70.0 mm de resina Dowex 50 W (x 8), la cual había sido lavada previamente - con NaOH 1 M; H<sub>2</sub>O; HCl 1 M y finalizando con agua. La solu--- ción del cetoácido de la columna se realizó con agua, ajustando cuidadosamente la velocidad del flujo a 1 gota cada 10 se-- gundos y colectando fracciones de 1.0 ml en viales con tapa de rosca. Habitualmente se colectaron 10 fracciones, de cada una de las cuales se tomó 1.0 microlitro con el que se impregnó - un papel filtro de 0.5 cm<sup>2</sup> de superficie y se determinó su con-- tenido de radioactividad en un espectómetro de centelleo lí-- quido Packard modelo Tri-Carb 3390. El cetoácido habitualmen-

te apareció en las fracciones 3, 4 y 5 las cuales se juntaron en una sola.

Con el objeto de reducir al mínimo posible la descomposición espontánea del cetoácido, la fracción resultante de la unión de las fracciones 3, 4 y 5, dependiendo de la cantidad total de radioactividad que tuviera, se dividió a su vez en fracciones con radioactividad suficiente cada una para realizar un experimento. No se neutralizó el pH ácido de las mismas (1.5 unidades) sino hasta el momento del experimento y se guardaron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La pureza del cetoácido fue confirmada por cromatografía ascendente en capa fina y elaboración del radiocromatograma correspondiente con el radiocromatógrafo del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición.

Medición de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada en células intactas (Dancis, et al., 1973).

Solución de tiamina-HCl (Merck): se prepara a una concentración de 100 mg/ml. Para ello, se disuelve 1.0 g de tiamina-HCl en 5.0 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y se ajusta el pH a 4.5 - 5.0 -- agregando 5.0 ml de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 2.0%. La -- temperatura deberá de estar entre 0 y  $5^{\circ}\text{C}$ . Se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Solución de Krebs-Ringer-Fosfato (DeLuca y Cohen, 1964).

NaCl (J.T. Baker) sol. 1, al	0.9%
KCl (J.T. Baker) sol. 2, al	1.15%
$\text{CaCl}_2$ (J.T. Baker ) sol. 3, al	1.22%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker) sol. 4, al	3.82%

Amortiguador de fosfato 0.1 M  
pH 7.4

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	17.8 g
HCl 1N	20.0 ml
Aforar a	1000.0 ml

Preparación: se mezclan 100 volúmenes de la solución de cloruro de sodio (solución 1), con 4 volúmenes de la solución 2, con 3 volúmenes de la solución 3, 1 volumen de la solución 4 y 20 volúmenes de la solución amortiguadora. La solución así preparada se gasea con O<sub>2</sub>, 3.0 l por minuto, durante 1 minuto. Se forma un precipitado de fosfato de calcio el cual se suspende por agitación antes de usarse la solución. Es estable durante una semana si se guarda en refrigeración. Cada una de las soluciones que la constituye es estable por meses si se guarda, sin mezclarse, en refrigeración, excepto el amortiguador de fosfato que deberá guardarse en congelación.

Leucina-1-<sup>14</sup>C (New England Nuclear)  
Valina-1-<sup>14</sup>C (New England Nuclear)

El aminoácido radioactivo es diluido en una solución de NaCl 0.08 M a 10.0 microCuries por ml. La actividad específica se ajusta a 0.5 microCuries por micromola y el pH aproximadamente a 3 con HCl o NaOH. La dilución se realiza horas antes de iniciar el experimento.

Hiamina, Amersham Corp.

Mezcla de centelleo:

Tolueno (Merck)	1000.0 ml
PPO (Amersham/Searle)	4.0 g
POPOP (Amersham/Searle)	50.0 mg

Procedimiento para la incubación: Antes de iniciar el experimento se prepara el amortiguador de Krebs-Ringer-Fosfato, se descongela la tiamina-HCl y se diluye y ajusta el pH del aminoácido radioactivo. A continuación, se despegan los fibroblastos de una botella T-75 totalmente confluyente mediante el uso de las soluciones de verseno y tripsina. Se resuspenden en 10.0 ml de medio de cultivo y se transfieren a tubos de plástico de centrifuga. Se sedimentan por centrifugación por 10 minutos a 2500 rpm en una centrifuga clínica. El botón así obtenido se resuspende en 10.0 ml de amortiguador Krebs-Ringer-Fosfato empleando un vórtex. Se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones. Este "lavado" de los fibroblastos con la solución amortiguadora se realiza un total de 3 -- veces. En la última ocasión, el botón celular es resuspendido en un volumen final de aproximadamente 1.0 ml de la solución de Krebs-Ringer-Fosfato. De esta manera, todas las células provenientes de una botella T-75 confluyente quedan resuspendidas en 1.0 ml, lo que permite tomar 3 fracciones de -- 0.275 ml cada una (0.825 ml en total) quedando un pequeño remanente en el tubo de centrifuga. Cada una de las 3 fracciones es colocada en un tubo de ensaye de 75X9.0 mm el cual se coloca dentro de otro de 150X15.0 mm. Los blancos se preparan con el mismo volumen de Krebs-Ringer-Fosfato, sin células. A continuación se agregan 0.005 mm de la solución de tiamina-HCl mediante el empleo de una pipeta Eppendorf. En el momento de iniciar la reacción, se colocan con pipeta Eppendorf --

0.025 ml de la solución con el aminoácido radioactivo, se oxigena al tubo conteniendo la mezcla de reacción (3 l/min, durante 15 segundos), se sella el tubo invirtiendo el tapón de hule (Curtin Scientific Co.) al que se encuentra fijo un pocillo de plástico (Kontes Glass Co.) y se coloca en baño maría a 37°C con agitación continua. El pH de la mezcla de reacción deberá de ser de 7.1 a 7.3. Se incuba por el tiempo convenido, usualmente 90 minutos. Al término del tiempo de incubación se para la reacción mediante la inyección, a través del tapón de hule, de 0.3 ml de ácido tricloroacético al 5.0%. Inmediatamente después y con extremo cuidado se inyectan, también a través del tapón, 0.3 ml de hiamina en el pocillito. Se transfieren los tubos a baño de hielo con agitación suave y se dejan incubar por 30 minutos más. Al finalizar este tiempo, con sumo cuidado se invierte el tapón de hule, se retira el pocillo con la hiamina, se corta de su soporte utilizando tijeras perfectamente afiladas y se coloca en un vial de centelleo con 10.0 ml de mezcla de centelleo. La radioactividad se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido Packard modelo Tri-Carb 3390 con una eficiencia superior al 90%.

Medición de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada en homogenados celulares (Danner y Elsas, 1975).

Amortiguador Tris-HCl-EDTA, pH 7.5

Tris-HCl (Sigma)	50.0 mM
EDTA (Sigma)	0.2 mM

Pirofosfato de tiamina, 0.15 mM (Sigma)

Coenzima A, reducida, 0.2 mM (Sigma)

Nicotinamida Adenín Dinucleótido, 0.2 mM (Sigma)

MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM (J.T. Baker)

Las cuatro últimas sustancias son estables por unos tres meses si son almacenados a -20°C y si se evita congelarlos y descongelarlos repetidamente fraccionándolos en -- alícuotas apropiadas.

Acido alfa-ceto-isovalérico-1-<sup>14</sup>C, 1 mCi/mM  
preparado a partir de valina-1-<sup>14</sup>C según se indicó anteriormente.

Procedimiento para la incubación: Antes de iniciar el experimento se descongela el frasco que contiene el ácido alfa-ceto-isovalérico. Dependiendo de la cantidad de radioactividad contenida en el frasco, se ajusta la actividad específica a 1.0 microCurie por micromola agregando ácido alfa-ceto-isovalérico no radioactivo. El pH de esta solución ácida se eleva utilizando 10.0 microlitros de NaOH 5N con lo que se llega a valores de 5.0 - 5.5. En todos los experimentos - realizados el volumen se ajustó de tal manera que en 40.0 microlitros se tuvieran 0,2 microCuries (con una actividad específica de 1.0 microCurie por micromola). El frasco fue gaseado suavemente con nitrógeno con el objeto de liberar a los contaminantes radioactivos volátiles.

103

Cuando en el ensayo se emplearon homogenados de fibroblastos, se procedió de manera análoga al punto anterior (fibroblastos intactos incubados con aminoácidos radioactivos) excepto que al finalizar el tercer enjuague, antes de resuspender al botón celular, el tubo de centrifuga se sumergió en un baño de hielo seco-acetona (-50°C) con lo que se rompieron las células. A partir de este momento y hasta antes de la incubación, todas las manipulaciones se hicieron en baño de hielo y con las soluciones previamente enfriadas.

En función del rendimiento proteico comunmente obtenido, el botón, una vez descongelado, se resuspendió en 0.5 ml de solución amortiguadora Tris-HCl-EDTA. De esta manera, se podían colocar fracciones de 120.0 microlitros -por triplicado, 0.360 ml-, en los tubos de ensaye, quedando un remanente aceptable para la determinación de proteína, además de que cada fracción de 120.0 microlitros contenía una cantidad tal de proteína que caía dentro del rango señalado como óptimo -- por Danner y Elsas (300-500 microgramos de proteína celular). A los tubos "blanco" se les colocó 120 microlitros de amortiguador Tris-HCl-EDTA.

A continuación se colocaron 10.0 microlitros de cada uno de los cuatro cofactores. La reacción fue iniciada al colocar 40.0 microlitros de ácido alfa-ceto-isovalérico radioactivo en el tubo de reacción, gasear con  $O_2$  al 95.0%, 3.0 -- 1/min. durante 15 segundo, sellar el tubo invirtiendo el ta--

104

pón de hule y transferir el tubo del baño de hielo a un baño maría a 37°C con agitación continua. Habitualmente se incubó por 90 minutos y la reacción se paró inyectando 0.25 ml de acetato de sodio (pH de 3.5). El resto de la incubación procedió de manera análoga al apartado anterior.

Cuando en el ensayo se utilizaron homogenados de fracciones enriquecidas con plaquetas, dichas fracciones se obtuvieron según se aplicó en el apartado correspondiente. Al finalizar el último enjuague y antes de resuspender al botón celular, el tubo que lo contenía se sumergió en un baño de hielo seco-acetona. Finalmente, el homogenado celular fue resuspendido en 1.0 ml de solución amortiguadora Tris-HCl-EDTA. El resto del ensayo se realizó igual que con los homogenados de fibroblastos.

De los diferentes remanentes de los homogenados celulares habitualmente se tomaron 5.0 o 10.0 microlitros para la determinación de proteínas por el método modificado de Lowry (Oyama & Eagle, 1956).

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

Una vez realizado el diagnóstico de enfermedad de orina de jarabe de arce en base a los elevados niveles plasmáticos de leucina y a la presencia de cetoácidos en orina, se procedió a instituir el tratamiento dietético. Como puede apreciarse en la Figura 8, con una dieta inicial de 2.5 g de proteína por kilogramo de peso corporal los niveles plasmáticos de leucina rápidamente descendieron desde valores -- superiores a 20.0 mg/dl. Sin embargo, con dicha cantidad de proteína dietética los niveles plasmáticos continuaron oscilando alrededor de 8.0 mg por dl, cifra todavía considerablemente elevada.

En un intento por llevar dicho nivel a valores más cercanos a los fisiológicos (2.0 mg/dl) la ingesta proteica se redujo sucesivamente a 2.0, 1.5 y 1.0 g por kg de peso. - A pesar de esto, los niveles no se normalizaron además de -- que el paciente comenzó a perder peso. Por lo tanto, se decidió suplementar la dieta hipoproteica con una mezcla de -- aminoácidos libre de leucina, isoleucina y valina. De esta manera, los niveles plasmáticos de leucina pudieron normalizarse completamente además de que el paciente comenzó a aumentar de peso. Solamente en una ocasión posterior a la nor

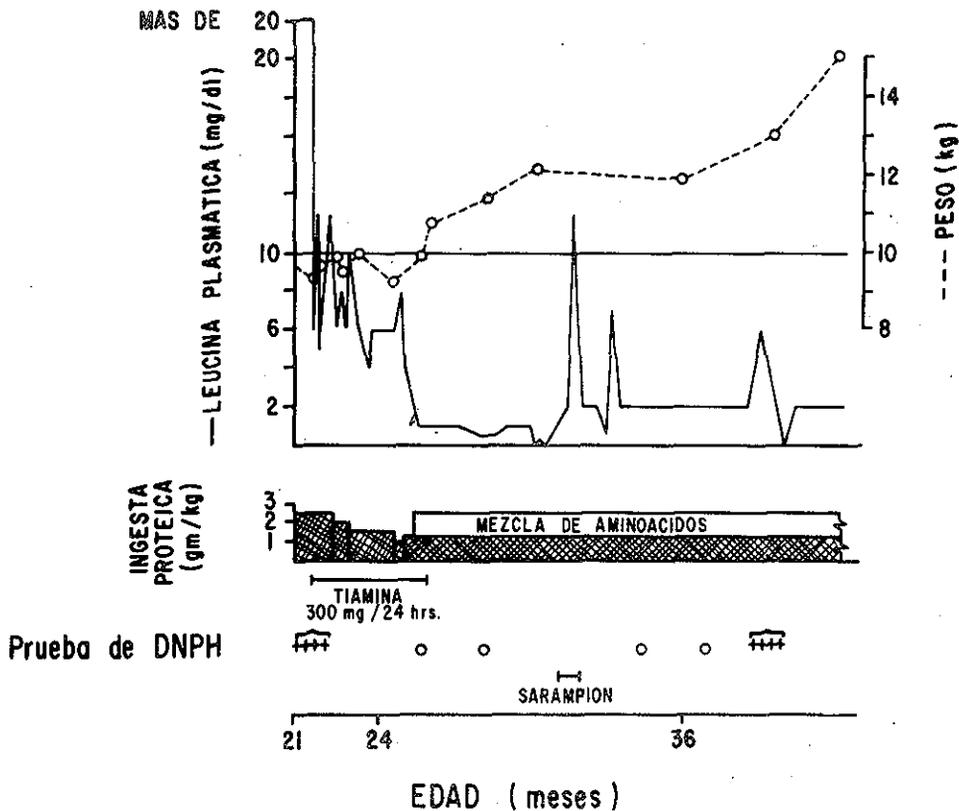


Figura 8. Respuesta al tratamiento dietético. La gráfica ilustra la -- correlación existente entre la ingesta proteica y los niveles plasmáticos de leucina (determinados por el método de Guthrie). Si bien la concentración plasmática normal del aminoácido es de 2.0 mg/dl, el nivel máximo permisible desde una perspectiva terapéutica es de 10.0 mg/dl. El tiempo de administración de dosis suprafarmacológicas de tiamina se indica en la parte media de la figura. En la parte inferior se indican los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de dinitrofenilhidrazina (DNPH) realizadas durante la primera fase del tratamiento.

FALLA EN CALVAR

malización de los niveles plasmáticos éstos rebasaron el nivel crítico de 10 mg por dl, lo cual coincidió con la aparición de un cuadro de sarampión.

Como puede observarse de la misma figura, la administración de dosis suprafarmacológicas de tiamina (300.0 mg/día) durante 10 días no produjo ningún efecto en los niveles de leucina ya que éstos no mostraron ningún cambio cuando se suspendió la administración del fármaco.

Los resultados de la medición indirecta de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada incubando fibroblastos intactos con leucina- $l-^{14}C$  y valina- $l-^{14}C$  se ilustran en la Figura 9 y en las Tablas 4 y 5. La figura muestra los primeros ensayos enzimáticos realizados con fibroblastos del paciente y de 2 controles normales utilizando leucina- $l-^{14}C$ . Es evidente tanto la completa linealidad obtenida durante los primeros 180 minutos de incubación así como la gran diferencia en la capacidad de decarboxilación del aminoácido radioactivo por las células normales y las células del paciente.

Cuando se incubaron los fibroblastos del paciente y de sus padres con leucina- $l-^{14}C$  se evidenció una vez más la baja actividad de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada del paciente, la cual fue de solo 6.67% con respecto a la actividad normal (Tabla 4). No deja de ser

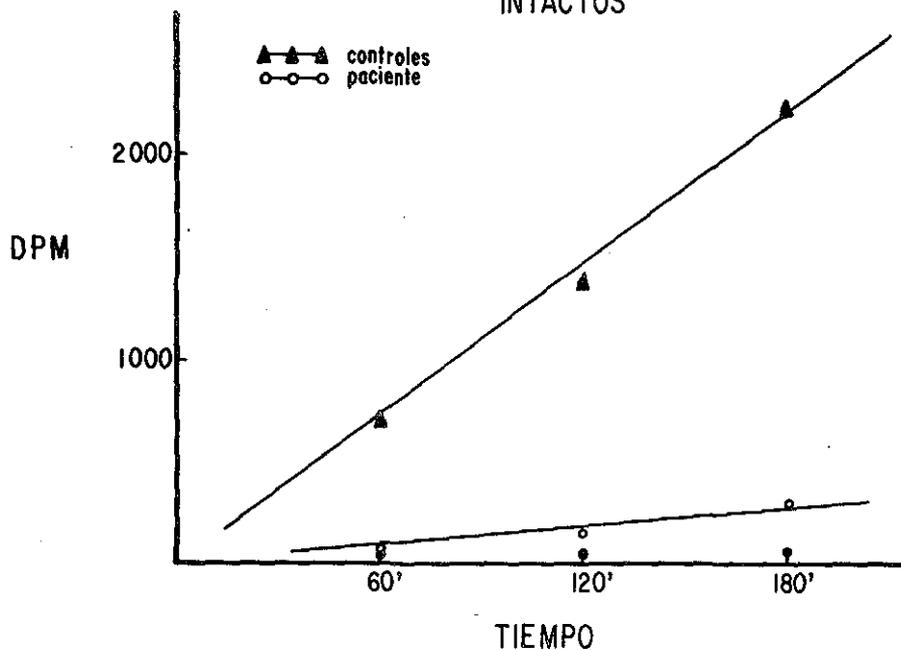
DECARBOXILACION DE LEUCINA-1-<sup>14</sup>C POR FIBROBLASTOS INTACTOS

Figura 9. Fibroblastos intactos del paciente y de dos controles normales fueron incubados con leucina-1-<sup>14</sup>C de acuerdo como se especificó en el texto (Material y Métodos), durante los períodos de tiempo indicados en la gráfica. Los valores graficados son el promedio de 2 experimentos diferentes realizados por triplicado, expresados como DPM por  $1 \times 10^6$  células después de haber restado los "blancos".

interesante, sin embargo, la elevada actividad enzimática de las células de los padres, los cuales, por ser heterocigotos obligados, sería más probable que tuvieran una actividad por debajo de los controles. Es importante mencionar a este respecto que si bien con frecuencia se observa que los heterocigotos para algún error innato del metabolismo poseen actividades enzimáticas con valores cercanos al 50% de la actividad de los controles, no ha sido posible identificar de una manera confiable a los heterocigotos de la enfermedad de orina de jarabe de arce utilizando al aminoácido radioactivo y células intactas ya que los valores así obtenidos no se apartan significativamente de los normales. Por otra parte, si se considera que nuestra población de controles normales en este caso estuvo compuesta por sólo 2 líneas celulares diferentes, es razonable suponer que la actividad enzimática tanto del padre como de la madre del paciente se encuentra probablemente dentro de límites normales y no elevada.

El empleo de valina-1-<sup>14</sup>C demostró una vez más la incapacidad de los fibroblastos del paciente para decarboxilar aminoácidos ramificados. Con este aminoácido, la actividad observada fue de sólo 2.48% con respecto a los controles (Tabla 5). Además, en este caso, tanto el padre como la madre del paciente alcanzaron valores inferiores al de los controles (44.6 y 65.5% respectivamente). Ello podría deberse al empleo de más líneas celulares normales (4) que -

TABLA 4

ACTIVIDAD DE DECARBOXILACION DE LEUCINA-1-<sup>14</sup>C  
POR FIBROBLASTOS HUMANOS

	Actividad (nmolas de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /10 <sup>6</sup> células/Hr.	% de actividad
Controles	0.65 (9) <sup>o</sup>	100.0
Paciente	0.043 <sup>+</sup> (5)	6.67
Padre	1.12* (3)	172.8
Madre	0.96* (3)	148.2

Fibroblastos intactos del paciente, de sus padres y de dos controles normales fueron incubados con Leucina-1-<sup>14</sup>C según se indica en el texto (Material y Métodos).

- <sup>o</sup> El número de experimentos está indicado entre paréntesis. cada experimento se realizó por triplicado.  
<sup>+</sup> Significativamente diferente de los controles (P < 0.001).  
\* No existen diferencias significativas.

111

TABLA 5

ACTIVIDAD DE DECARBOXILACION DE VALINA-1-<sup>14</sup>C  
POR FIBROBLASTOS HUMANOS

	Actividad (nmolas de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /mg de proteína/Hr.)	% de actividad
Controles	2.42 (4) <sup>o</sup>	100.0
Paciente	0.06 <sup>+</sup> (4)	2.8
Padre	1.08* (3)	44.6
Madre	1.56* (3)	64.5

Fibroblastos intactos del paciente, de sus padres y de cuatro controles normales fueron incubados con valina-1-<sup>14</sup>C según se indica en el texto (Material y Métodos).

- <sup>o</sup> El número de experimentos está indicado entre paréntesis. Cada experimento se realizó por triplicado.
- <sup>+</sup> Significativamente diferente de los controles -- (P < 0.001).
- <sup>\*</sup> Significativamente diferentes de los controles -- (P < 0.001).

que cuando se hicieron las mediciones con leucina-1-<sup>14</sup>C.

Con el objeto de obtener una medición más precisa - del complejo enzimático tanto del paciente como de sus padres se procedió a determinar la actividad del mismo empleando homólogos celulares incubados con algunos de los sustratos reales de la enzima (cetoácidos de cadena ramificada). De esta manera se evitarían los pasos previos que intervienen cuando se emplean células intactas y aminoácidos radioactivos tales como transporte membranal y citoplásmico del aminoácido, --- transaminación del mismo y su transporte hasta mitocondria, - todo ello dentro del complejo marco de interacciones metabólicas de la célula intacta. Puesto que Danner y Elsas (Danner y Elsas, 1975) observaron que la actividad enzimática máxima en células normales se observa al emplear ácido alfa-ceto- - isovalérico, se decidió emplear dicho sustrato en las subse- - cuentes mediciones.

La preparación de este cetoácido se realizó a partir de valina-1-<sup>14</sup>C incubada con L-amino oxidasa según se explicó en el capítulo de Material y Métodos. Como es fácil -- suponer, la pureza del cetoácido es de suma importancia para la correcta determinación de la actividad de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada. Consecuentemente, con el objeto de corroborar dicha pureza se sometió al cetoácido radioactivo a la prueba de la dinitrofenilhidrazina con posterior cromatografía ascendente en capa fina de la dinitrofenil

hidrazona formada. De esta manera, se obtuvo un cromatograma en el que claramente se apreciaba una sola mancha correspondiente al derivado de la dinitrofenilhidrazona (Figura 10). Dicho cromatograma fue posteriormente analizado por radiocromatografía con la finalidad de observar la distribución de la radioactividad a lo largo del mismo. La misma Figura 10 muestra la absoluta correspondencia entre la mancha del derivado de la dinitrofenilhidrazona y la localización de la zona con el máximo contenido de radioactividad. Con ello pudo concluirse que la pureza del ácido alfa-ceto-isovalérico preparado fue totalmente satisfactoria.

Por otra parte, dado que por su fácil decarboxilación espontánea el empleo del alfa-ceto-isovalerato es difícil y laborioso y de que además diferentes problemas técnicos tales como velocidad de crecimiento, contaminación bacteriana y por hongos, número insuficiente de células, etc. dificultan el empleo indiscriminado de células en cultivo, se decidió montar la técnica de medición de decarboxilación del alfa-ceto-isovalerato en homogenados de fracciones celulares enriquecidas con plaquetas. El motivo de haber escogido a estas células fue el de que algunos autores las consideran como las más apropiadas para este tipo de mediciones por su aparente relativa abundancia de mitocondrias (Cederbaum, comunicación personal). Como se recordará, la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada tiene una localización intramitocondrial por lo que parecía atractivo poder trabajar con células

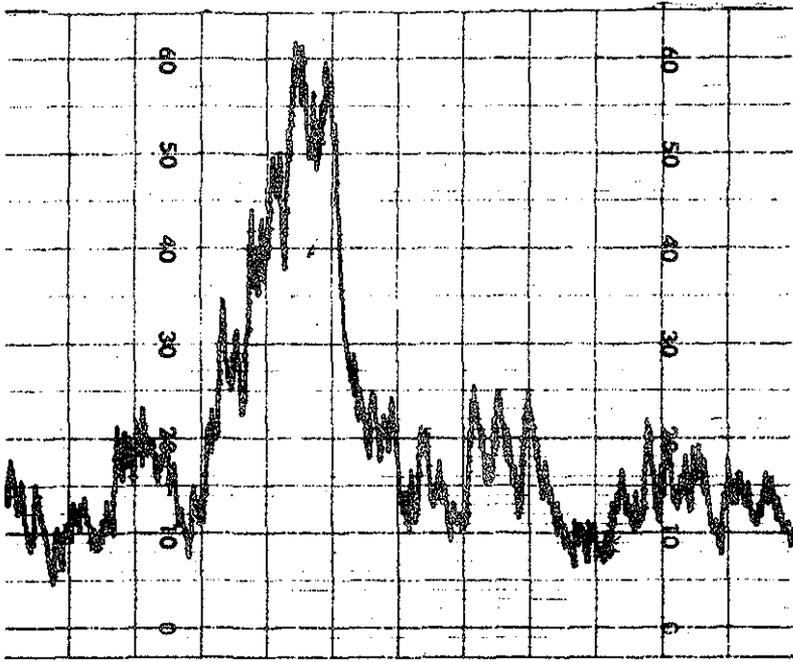


Figura 10. Pureza del ácido-alfa-ceto-isovalérico- $l$ - $^{14}C$ . Con el objeto de comprobar la pureza del ácido alfa-ceto-isovalérico- $l$ - $^{14}C$ , se tomaron 10.0 microlitros de la solución de dicho cetoácido radioactivo (el cual se preparó según se indicó en Material y Métodos) de donde se obtuvo al derivado de la dinitrofenilhidrazona (Thomas y Howell, 1973). Muestras de la solución del derivado fueron aplicadas por duplicado en una placa de silica-gel y sometidas a cromatografía ascendente durante 5 horas. Una vez que las manchas amarillas aparecieron espontáneamente (parte superior de la figura), se estudió la distribución de la radioactividad a lo largo del cromatograma (parte inferior de la figura) mediante un radiocromatógrafo Packard con un 80% de eficiencia. El pico del radiocromatograma indica el sitio con máxima concentración de radioactividad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

fáciles de obtener y ricas en mitocondrias.

La Tabla 6 ilustra los resultados obtenidos en la determinación de la actividad enzimática en muestras provenientes de 11 individuos normales diferentes. Puede observarse cómo los valores máximos y mínimos obtenidos oscilaron entre 0.81 y 0.21 nmolas de  $^{14}\text{CO}_2$  por hora de incubación por miligramo de proteína respectivamente, con una media de  $0.48 \pm 0.19$ . Esta observación es sumamente interesante ya que contrasta de manera notable con los valores reportados por Danner y Elsas (Danner y Elsas, 1975) para la decarboxilación del mismo cetoácido, bajo idénticas condiciones de ensayo enzimático, por homogenados de fibroblastos normales. En una serie de experimentos, los mencionados autores observaron una actividad promedio de 5.0 nmolas de  $^{14}\text{CO}_2/\text{mg}$  de proteína/Hr., esto es, una cifra un orden de magnitud mayor que aquella obtenida por nosotros. A primera vista, este hallazgo parecería sugerir la existencia de una mayor actividad de deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada en fibroblastos que en células plaquetarias. La confirmación de esta suposición requeriría, claro está, de estudios enzimáticos más precisos. Sin embargo, algunos hallazgos mencionados más adelante permiten considerar otras explicaciones.

Debido a la relativa dispersión de los valores obtenidos a partir de las diferentes muestras y con el objeto de facilitar la comparación de los mismos, se decidió expre-

TABLA 6

ACTIVIDAD DE DECARBOXILACION DE ACIDO ALFA-CETO-ISOVALERICO-1-<sup>14</sup>C POR HOMOGENADOS DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS CON PLAQUETAS -INDIVIDUOS NORMALES-

Individuo	Actividad enzimática (nmolas de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /mg proteína/Hr.)	Coefficiente de variación (%)
1	0.68 ± 0.06	8.8
2	0.69 ± 0.01	1.4
3	0.62 ± 0.03	4.8
4	0.39 ± 0.06	15.4
5	0.21 ± 0.02	9.5
6	0.36 ± 0.03	8.3
7	0.26 ± 0.02	7.7
8	0.35 ± 0.06	17.1
9	0.46 ± 0.02	4.3
10	0.49 ± 0.04	8.2
11	0.81 ± 0.01	1.2
$\bar{X}$	0.48 ± 0.19	39.6

Homogenados de fracciones plasmáticas enriquecidas - con plaquetas provenientes de 11 individuos normales fueron incubados con ácido alfa-ceto-isovalérico-1-<sup>14</sup>C según se indica en el texto.

Cada experimento se realizó en días diferentes.

Los valores reportados son el promedio y la desviación estandar de cada experimento realizado por triplicado.

sar a dichos valores en una relación porcentual a través de su coeficiente de variación (Spiegel, 1970), según se ilustra en la tercera columna de la Tabla 6. Se aprecia como -- las determinaciones realizadas en las muestras de algunos individuos prácticamente no variaron ( $V = 1.2\%$ ) mientras que -- otras mostraron una amplia variación ( $V = 17.1\%$ ). Ello po--dría indicar la aparente imprecisión del ensayo enzimático -- cuando se utilizan homogenados de fracciones enriquecidas -- con plaquetas. Sin embargo, como se discutirá más adelante, esta variabilidad también puede tener otras posibles explicaciones.

Puesto que se utilizó un tipo de células para el -- que previamente no existían reportes sobre la actividad de -- la enzima en cuestión, era indispensable conocer la relación de la actividad enzimática con respecto al tiempo y a la concentración de proteína celular. La Figura 11 muestra la linealidad existente entre la actividad enzimática y el tiempo en valores hasta de 90 minutos; mientras que en la Figura 12 la linealidad dada por la actividad enzimática con respecto a la concentración de proteína también es evidente dentro del rango de los 400.0 y 1000.0 microgramos de proteína celular. Estos datos sugieren fuertemente que nos encontramos -- frente a una actividad enzimática real y no ante la descomposición espontánea del sustrato.

110

118

DECARBOXILACION DE ACIDO  $\alpha$ -CETO-ISOVALERICO-1- $^{14}$ C  
POR HOMOGENADO DE FRACCION ENRIQUECIDA DE  
PLAQUETAS NORMALES

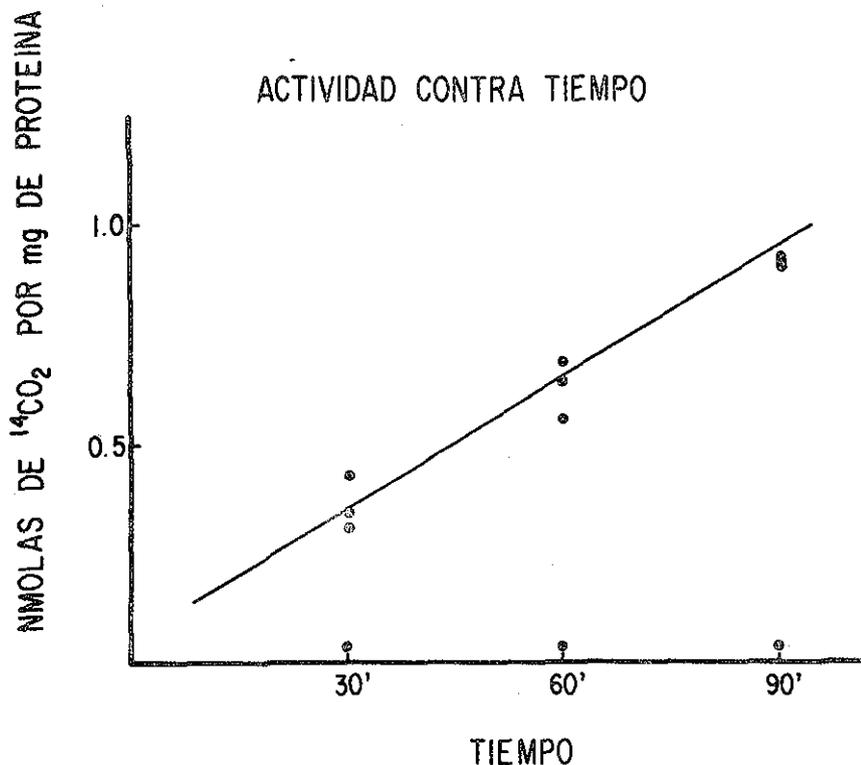


Figura 11. Homogenados de fracciones plasmáticas enriquecidas con plaquetas provenientes de un individuo normal fueron incubados con ácido alfa-ceto-isovalérico-1- $^{14}$ C de acuerdo como se especificó en el texto (Material y Métodos), durante los períodos de tiempo indicados en la gráfica. Los valores graficados son el promedio de un experimento realizado por triplicado después de haber restado los "blancos".

111  
DECARBOXILACION DE ACIDO  $\alpha$ -CETO-ISOVALERICO-1- $^{14}$ C  
POR HOMOGENADO DE FRACCION ENRIQUECIDA DE  
PLAQUETAS NORMALES

119

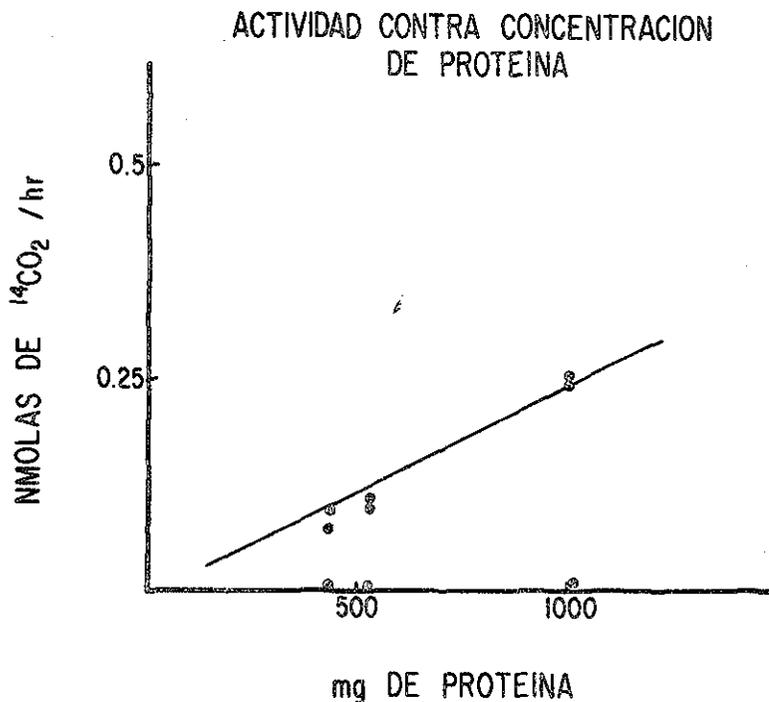


Figura 12. Homogenados de fracciones plasmáticas enriquecidas con plaquetas provenientes de un individuo normal fueron incubados con ácido alfa-ceto-isovalérico-1- $^{14}$ C de acuerdo como se especificó en el texto (Material y Métodos), a las diferentes concentraciones de proteína indicadas en la gráfica, durante 60 minutos. Los valores graficados son el promedio de un experimento realizado por triplicado después de haber restado los "blancos".

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En vista de los resultados obtenidos se consideró que ya se había alcanzado un dominio razonable de la metodología por lo que se procedió a realizar este tipo de mediciones en homogenados de fracciones enriquecidas con plaquetas, del paciente y de sus padres. Los resultados de estos experimentos se reportan en la Tabla 7. Los valores obtenidos - por los controles normales (0.59 nmolas de  $^{14}\text{CO}_2$ /mg de proteína/Hr.) son nuevamente similares a los obtenidos previamente en la serie analizada de muestras de individuos normales -- (Tabla 7). Por otra parte, los padres del paciente mostraron una actividad enzimática que los colocó entre un 61.0% y 79.7% (padre y madre, respectivamente) de los valores normales. Sin embargo, con las muestras del paciente se observó, sorprendentemente, una actividad enzimática prácticamente normal (88.1% con respecto a los controles).

Como era la primera vez que se medía directamente a la enzima del paciente en homogenados celulares existía, por una parte, la posibilidad de que este resultado tan inesperado pudiera tener considerables implicaciones bioquímicas. -- Pero, por otra parte, esta observación también obligaba nuevamente a reconsiderar las posibles explicaciones a los valores tan bajos mostrados por nuestros controles comparativamente - con los obtenidos al emplear homogenados de fibroblastos --- (Danner y Elsas, 1975) por lo que, antes de que se empezaran a explorar posibles explicaciones de este hallazgo (actividad

TABLA 7

ACTIVIDAD DE DECARBOXILACION DE ACIDO ALFA-CETO-  
ISOVALERICO-1-<sup>14</sup>C POR HOMOGENADOS DE FRACCIONES  
ENRIQUECIDAS CON PLAQUETAS

	Actividad (nmolas de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /mg proteína/Hr.)	% de actividad
Controles	0.59	100.0
Paciente	0.52	88.1
Padre	0.36	61.0
Madre	0.47	79.7

Homogenados de fracciones plasmáticas enriquecidas con plaquetas provenientes del paciente, de sus padres y de dos controles normales fueron incubados con ácido alfa-ceto-isovalérico-1-<sup>14</sup>C según se indica en el texto (Material y Métodos). Cada experimento se realizó por triplicado.

enzimática aparentemente normal en homogenados de plaquetas - del paciente), era indispensable estudiar la actividad enzimática en homogenados de fibroblastos.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los experimentos en los que los homogenados de fibroblastos fueron incubados con el cetoácido radioactivo. Destaca inmediatamente el hecho de que la actividad observada en los controles es ahora, en promedio, de 2.27 nmolas de  $^{14}\text{CO}_2/\text{mg}$  de proteína/Hr., valor bastante cercano al de 5.0 nmolas de  $^{14}\text{CO}_2/\text{mg}$  de proteína/Hr. reportado por el grupo de Danner y Elsas y muy por arriba de los valores de 0.59 y 0.48 nmolas de  $^{14}\text{CO}_2/\text{mg}$  de proteína/Hr. observados por nosotros en homogenados de plaquetas. En función de estos resultados, los valores obtenidos con las células del paciente vuelven a ser concordantes con los obtenidos previamente al incubar células intactas con alguno de los aminoácidos radioactivos ya que la actividad fue de solo el 10.1% de lo normal (Tabla 8). Además, parecería que mediante este método es ahora posible diferenciar a los heterocigotos de los homocigotos normales y que aparentemente pueden incluso diferenciarse a los heterocigotos entre sí (padre: 39.7% de la actividad normal; madre: 59.9% de actividad normal). Esta posibilidad, sin embargo, requerirá de un mayor número de observaciones en heterocigotos obligados antes de poder considerar a este ensayo como confiable para la diferenciación de los mismos.

TABLA 8

ACTIVIDAD DE DECARBOXILACION DE ACIDO ALFA-CETO-  
ISOVALERICO-1-<sup>14</sup>C POR HOMOGENADOS DE FIBROBLASTOS EN CULTIVO

	Actividad (nmolas de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /mg proteína/Hr.)	% de actividad
Controles	2.27 (7) <sup>+</sup>	100.0
Paciente	0.23* (5)	10.1
Padre	0.90* (5)	39.7
Madre	1.36* (5)	59.9

Homogenados de fibroblastos en cultivo del paciente, de -- sus padres y de cuatro controles normales fueron incubados con ácido alfa-ceto-isovalérico-1-<sup>14</sup>C según se indica en el texto (Material y Métodos).

<sup>+</sup>El número de experimentos está indicado entre paréntesis. Cada experimento se realizó por triplicado.

\*Significativamente diferente de los controles (P < 0.01).

## DISCUSION

La serie de determinaciones de actividad enzimática reportadas en el presente trabajo han permitido confirmar bioquímicamente el primer diagnóstico que se hace en México de un caso de enfermedad de orina de jarabe de arce al demostrar una disminución de la actividad de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada tanto en fibroblastos intactos -- como en homogenados celulares.

Si bien todos los casos reportados de esta enfermedad hasta 1977 se habían caracterizado por una elevación plasmática de los tres aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) y de sus respectivos cetoácidos (alfa-ceto-isocaproico, alfa-ceto-beta-metilvalérico y alfa-ceto-isovalérico) por una deficiente decarboxilación oxidativa de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada, no es posible asegurar que dicha elevación se deba, en todos los casos, a una deficiente actividad del complejo mencionado. Como se recordará, Harkness y sus asociados reportaron el caso de un paciente con los signos y síntomas clásicos de la enfermedad pero con una actividad normal de la deshidrogenasa de los cetoácidos de cadena ramificada (Harkness, et al., 1977). Esta observación es especialmente crítica cuando se contempla la -

posibilidad de realizar diagnóstico prenatal ya que, de estar frente a esta variedad de la enfermedad, la determinación de la actividad enzimática en células obtenidas de líquido amniótico carece de utilidad. Ello era de gran importancia para los padres del paciente, ya que se trata de un matrimonio joven que desea tener más hijos pero a quién también interesa estar informado sobre el posible estado de salud del producto en gestación. Gracias a este tipo de mediciones enzimáticas será posible realizar diagnóstico prenatal en futuros embarazos y, de llegarse a un diagnóstico de morbilidad, podría ofrecerse a los padres, entre otras alternativas, la de instituir una terapéutica adecuada desde el momento del nacimiento con lo que se le permitiría al recién nacido llegar a la vida adulta con un desarrollo sicomotor perfectamente normal.

La determinación de la actividad enzimática residual era también de considerable importancia para facilitar y hacer más racional la selección del tratamiento dietético. Como ya fue mencionado en el capítulo II de este trabajo a propósito de las diferentes variedades de la enfermedad de orina de jarabe de arce, Dancis y su grupo han observado una correlación entre los niveles de actividad enzimática residual en fibroblastos y leucocitos y la tolerancia a los aminoácidos dietéticos así como la severidad del cuadro clínico. Por lo que respecta a nuestro paciente, el diagnóstico de su enfermedad no se hizo sino hasta la edad de 21 meses. Para entonces, su retraso sicomotor era considerable además de que con fre--

cuencia presentaba crisis de cetoacidosis y convulsiones. De cualquier manera, el cuadro clínico no había sido lo suficientemente severo como para haber ocasionado la muerte del paciente durante sus primeras semanas de vida como habitualmente se observa en la variedad clásica (grado 1 de la clasificación - de Dancis) no tratada. Desde este punto de vista, la enfermedad parecía corresponder mas bien a la variedad intermedia o intermitente (grado 2 y 3, respectivamente).

Antes de iniciarse el tratamiento, los niveles plasmáticos de leucina en el paciente se encontraban por arriba de los 20.0 mg/ (Figura 8, p. 106). Como fue mencionado, al indicarse una dieta basada en una ingesta proteica diaria de 2.5 g por kg de peso, los niveles plasmáticos de leucina descendieron rápidamente, pero no llegaron a normalizarse. Ni aún cuando la ingesta proteica fue disminuída a 1.0 g por kg de peso - pudieron alcanzarse cifras normales. Por el contrario, los niveles de leucina volvieron a elevarse y el paciente empezó a perder peso. La normalización de dichos niveles sólo fue posible cuando la dieta hipoproteica fue suplementada con una mezcla libre de aminoácidos de cadena ramificada, con lo cual también se logró que comenzara a ganar peso.

Estas observaciones nos indican que la tolerancia -- del paciente a la proteína dietética es muy reducida, por lo que es poco probable que esté afectado por la variedad intermitente, con lo que esta posibilidad puede descartarse. Pero

también muestran como una ingesta proteica demasiado baja compromete la síntesis proteica ocasionando una significativa -- alteración de la misma traducida por un aumento de los niveles plasmáticos de leucina al ser mayor el catabolismo proteico endógeno que el anabolismo y una disminución del peso corporal. Al agregar un complemento de aminoácidos dietéticos, esta situación se corrige completamente con lo que los valores plasmáticos de leucina se normalizan al restablecerse la síntesis normal de proteínas y tejidos y el paciente comienza a aumentar de peso. Nada de esto se observó al administrar la vitamina tiamina en dosis suprafarmacológica.

Como puede apreciarse en la misma figura, solo en una ocasión se alteraron considerablemente los valores plasmáticos de leucina. Ello coincidió con un momento de estrés -- del paciente al enfermarse de sarampión, lo cual, muy probablemente, se tradujo en un catabolismo proteico aumentado. Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de esta alteración, el paciente no presentó en ningún momento alguna manifestación clínica propia de la enfermedad.

Por todo lo mencionado líneas arriba con respecto a la severidad del cuadro clínico y a la tolerancia de ingesta proteica puede concluirse que se contaba con evidencia suficiente para hacer el diagnóstico de un caso de enfermedad de orina de jarabe de arce, no susceptible de tratamiento con --

dosis suprafarmacológicas de tiamina, de la variedad intermedia (grado 2 de la clasificación de Dancis). Sin embargo, en función del considerable grado de heterogeneidad genética observado en la gran mayoría de los errores innatos del metabolismo, era interesante confirmar este diagnóstico determinado la actividad enzimática en células en cultivo tanto del paciente como de sus padres.

El empleo de células intactas incubadas con alguno de los aminoácidos de cadena ramificada marcados radioactivamente en el grupo carboxilo, refleja de una manera más realista, como ya fue mencionado anteriormente, las complejas interrelaciones metabólicas de la célula, por lo que la información obtenida a partir de este tipo de experimentos puede llegar a ser en un momento dado, sumamente valiosa.

Como se esperaba, la actividad enzimática residual mostrada por los fibroblastos en cultivo del paciente empleando leucina o valina- $l-^{14}C$  fue de solo 6.67 y 2.48% de lo normal, respectivamente. Esto es, en ningún momento fueron menores de 2.0% ni mayores de 8.0% de la actividad normal lo que permite afirmar que nos encontramos frente a un paciente con el Grado 2 (intermedio) de la enfermedad. No deja de llamar la atención, sin embargo, que tanto el padre como la madre del paciente (heterocigotos obligados) hubieran mostrado una actividad enzimática aparentemente por arriba de los controles normales al utilizar leucina- $l-^{14}C$  como sustrato. In-

dependientemente de que sólo se usaron dos líneas celulares - como controles y que, puesto que este tipo de mediciones obedece a una distribución de tipo normal -por lo que dichas líneas celulares podrían situarse, en función de su actividad - enzimática, por debajo de la media- la observación es sumamente interesante ya que ilustra, una vez más, la enorme heterogeneidad genética existente. Así como existe una gran variedad de estaturas en la especie humana, de la misma manera es razonable suponer la existencia de una enorme variabilidad en la actividad de una determinada enzima. Parecería entonces - como una posibilidad, que los resultados obtenidos al emplear leucina-1-<sup>14</sup>C más que mostrarnos una actividad enzimática elevada en heterocigotos obligados, nos muestran una actividad - baja, pero todavía dentro de lo normal, de los controles empleados.

Ello resulta más claro al comparar nuestros resultados con los del grupo de Dancis (Dancis, et al., 1972). -- Mientras que nuestras determinaciones (en células normales) - mostraron una actividad de solo 0.65 nmolas de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/10<sup>6</sup> células/Hr., Dancis y sus asociados obtuvieron 1.3 nmolas de -- <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/10<sup>6</sup> células/Hr., esto es, exactamente el doble. De haber llegado nosotros a un valor similar, el padre de nuestro paciente tendría un 86.0% de actividad normal y la madre un - 73.8% de lo normal además de que la actividad enzimática relativa del paciente se reduciría de 6.67% a 3.3% de lo normal.

Por el contrario, al utilizar valina-1- $^{14}\text{C}$ , si bien los resultados no son totalmente comparables puesto que nosotros los reportamos por miligramos de proteína (a diferencia de Dancis que los reporta por número de células) de cualquier manera son bastante más parecidos ya que Dancis reporta 1.9 nmolas de  $^{14}\text{CO}_2/10^6$  células/Hr. contra 2.42 nmolas de  $^{14}\text{CO}_2/\text{mg}$  de proteína/Hr. observado por nosotros al emplear mayor número de controles normales.

La medición directa de la actividad enzimática empleando homogenados de fibroblastos en cultivo y ácido alfa-ceto-isovalérico demostró una vez más una disminución muy considerable de dicha actividad en muestras del paciente (10.1% de lo normal) aunque ésta fue un poco mayor que la observada al utilizar fibroblastos intactos (Tabla 8, p. 123). Pero además, gracias a este tipo de experimentos pudieron ser diferenciados claramente los heterocigotos de los homocigotos normales, diferenciación no siempre posible al utilizar células intactas.

Como ha sido mencionado en repetidas ocasiones a lo largo del presente trabajo, uno de los intereses fundamentales en la realización del mismo consistió en la investigación de la heterogeneidad genética a nivel molecular. Además de los argumentos presentados en favor de este punto de vista en el Capítulo I (Errores Innatos del Metabolismo) lo cuales pretendieron hacer énfasis sobre la individualidad anatómica, fi

iológica, conductual, metabólica y bioquímica de los organismos desde una perspectiva teórica, individuos afectados por alguna enfermedad como la de orina de jarabe de arce muy probablemente sean heterocigotos compuestos más que homocigotos mutantes, especialmente cuando no hay consanguinidad entre los padres. Todo ello en vista de que si se acepta la incidencia de esta enfermedad como de 1 individuo afectado por cada 200,000 nacimientos, la frecuencia de los heterocigotos portadores será de 1 por cada 225 individuos ( $2 pq = 4.5 \times 10^{-3}$ ) aproximadamente. Con esta frecuencia, es muy probable que hayan surgido diferentes alelos mutantes que expliquen las diferentes variedades de esta enfermedad conocidas hasta este momento. Por lo tanto, no es aventurado afirmar que cada nuevo paciente representa un tipo diferente de anomalía enzimática. Esta "individualidad patológica" seguramente podría ser descubierta en todos los casos estudiando directamente al individuo afectado, siempre y cuando nuestros métodos de análisis fueran lo suficientemente sensibles. Gracias a este tipo de estudios es que ahora se conocen algunas variantes de la enfermedad. Pero también es muy probable que individuos afectados por la enfermedad y con actividades enzimáticas residuales aparentemente similares tengan realmente alteraciones enzimáticas diferentes.

Por los resultados reportados en la Tabla 8 parecería que el tipo de mutación que afecta a la madre del paciente es de una naturaleza menos severa que aquella que afecta -

al padre ya que la actividad residual es de 59.9 y 39.7% de lo normal respectivamente. Curiosamente, estos valores son bastante similares a los obtenidos al incubar fibroblastos in tactos con valina- $l-^{14}C$  ya que entonces se obtienen cifras de 64.5 y 44.6% de lo normal respectivamente. Podría ser entonces que el paciente realmente fuera un heterocigoto compuesto y no un homocigoto mutante. Sin embargo, estos datos podrían también estar reflejando algún fenómeno diferente al de heterogeneidad genética ya que tanto Dancis como McKnight han reportado una aparente mayor reducción de la actividad enzimática en los padres de los pacientes que en las madres (Dancis, et al., 1965; McKnight y Spence, 1972). De llegar a confirmarse plenamente esta observación deberá entonces de elaborarse una hipótesis alterna. Posiblemente, un análisis de este problema considerado desde una perspectiva análoga a la de los caracteres controlados por el sexo podría dar sugerencias interesantes (Stern, 1973).

Tampoco es totalmente claro porqué cuando se intentó medir la actividad enzimática en homogenados de fracciones enriquecidas con plaquetas las muestras obtenidas del paciente mostraron una actividad prácticamente igual a la de los controles y, sobretodo, porqué éstos la tuvieron comparativamente -- tan baja, casi ausente.

Puesto que la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada tiene una localización intramitocondrial, una posi-

ble explicación para la ausencia de dicha actividad enzimática podría ser la de un contenido bajo de mitocondrias por parte de la plaqueta. A este respecto, los tratados de histología señalan la presencia de solo 1 ó 2 mitocondrias en un corte delgado de plaquetas (Ham, 1970, p. 307) contra unas 1000 a 1600 en cortes de hepatocitos (DeRobertis, et al., 1975, p. 203), lo cual sugeriría que el contenido total de dicho organelo por la plaqueta es muy reducido. Sin embargo, algunos autores que han determinado la actividad de la piruvato y alfa-ceto-glutarato deshidrogenasas tanto en homogenados de fracciones enriquecidas con plaquetas preparados de manera análoga a la nuestra, como de fibroblastos en cultivo, reportan haber obtenido resultados similares en ambos tipos de preparaciones (Cederbaum, et al., 1976; Blass, et al., 1977). Estos datos parecen indicar que la cantidad total de actividad de la piruvato y alfa-ceto-glutarato deshidrogenasas es similar en fibroblastos y plaquetas, lo cual no es sorprendente si se considera la extraordinaria importancia y ubicuidad de las vías metabólicas a las que dichas enzimas pertenecen. Además, es importante recordar que las plaquetas son realmente fragmentos celulares sumamente pequeños y que por lo tanto, la cantidad de mitocondrias por mg de proteína celular es posiblemente similar tanto en preparados de tejido hepático como de plaquetas.

Por otra parte, como ya fue mencionado en el capítulo II, la actividad de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada no se encuentra distribuída universalmente en los diferentes tejidos del organismo. Por el contrario, su actividad es máxima en la célula hepática y considerablemente menor en el tejido muscular por lo que, considerado bajo esta perspectiva, es razonable pensar en la posibilidad de que dicha actividad estuviera totalmente ausente en las plaquetas, lo cual explicaría satisfactoriamente nuestros resultados. Sin embargo, dicha actividad deberá necesariamente encontrarse en alguna o algunas de las fracciones purificadas de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y/o basófilos puesto que, como se indicó, diversos autores la han medido múltiples veces utilizando preparados no fraccionados de leucocitos.

El hecho de que los valores mostrados por los controles sean sólo un 25.0% de los obtenidos al emplear homogenados de fibroblastos y muestran una considerable variabilidad así como lo ya mencionado de que las actividades enzimáticas de los controles, del paciente y de sus padres sean muy similares, podría ser indicativo de que lo que realmente se está midiendo es la decarboxilación inespecífica del cetoácido por alguna deshidrogenasa diferente a la de cetoácidos de cadena ramificada. Kanzaki y sus asociados reportan haber observado una ligera actividad de decarboxilación de la piruvato deshidrogenasa de corazón de cerdo hacia el ácido alfa-ce-

to-isovalérico (14.5% con respecto a piruvato) mientras que - la alfa-ceto-glutarato deshidrogenasa, con una mayor especificidad por su sustrato, prácticamente no mostró ninguna actividad hacia el alfa-ceto-isovalerato (Kanzaki, et al., 1969). - Claro está que es posible que otra u otras deshidrogenasas -- aparte de las ya mencionadas, contribuyesen a la supuesta decarboxilación inespecífica observada. Puede descartarse una decarboxilación espontánea del sustrato en función de la linealidad observada de la actividad con respecto al tiempo y a la concentración de proteína, además de los bajos valores obtenidos con los "blancos".

Podría suponerse también la existencia en las plaquetas de una deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada especialmente lábil (ya fuera por su estructura intrínseca, por su forma de asociación a membrana, etc.) y cuya actividad prácticamente desapareciera durante el procedimiento de homogenización por lo que entonces posiblemente estaríamos midiendo una decarboxilación inespecífica.

Otra explicación, aunque menos probable, supondría la existencia de alguna(s) isoenzima(s) de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada, diferente a la hepática - (la cual necesariamente sería la fisiológicamente importante), renal, de fibroblastos y leucocitos, producto, claro está, de un gene diferente al mutado. En este caso, dicha(s) isoenzima(s) mostraría normalmente una actividad menor que la de los

fibroblastos y leucocitos (alrededor de un 75.0% menor en -- "concentrados" plaquetarios); no se expresaría en hígado, riñón, fibroblastos o leucocitos y por ser un producto génico -- diferente al del gene responsable de la enfermedad de orina -- de jarabe de arce, su actividad, tanto en plaquetas de individuos afectados como en sujetos normales sería similar.

La investigación de esta última hipótesis implica-- ría realizar estudios de cinética enzimática para la determi-- nación de parámetros tales como  $K_M$ ,  $K_I$ , y  $V_{Max}$  así como de determinación de temperatura y pH óptimos con los cuales sería posible diferenciar la existencia de alguna posible isoenzima de la decarboxilación inespecífica por alguna deshidrogenasa.

## CAPITULO VI

## CONCLUSION

Las diversas determinaciones de actividad enzimática reportadas en el presente trabajo han permitido realizar la primera confirmación bioquímica efectuada en México de una mutación responsable de la enfermedad de orina de jarabe de arce al demostrar una disminución mayor de un 90.0% de la actividad de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada, tanto en fibroblastos intactos como en homogenados del mismo tipo de células provenientes del paciente. En base al cuadro clínico presentado por el paciente, a su tolerancia a la ingesta proteica y a su actividad enzimática residual podemos afirmar que dicho paciente corresponde al Grado 2 de la enfermedad de acuerdo a la clasificación de Dancis (variedad intermedia para algunos autores). Puesto que es posible el diagnóstico prenatal de esta variedad de la enfermedad así como un tratamiento dietético efectivo, los futuros hermanos afectados del paciente serán susceptibles de un tratamiento oportuno lo que les garantizará alcanzar una vida adulta normal.

Debido a la considerable sobreposición observada por diferentes autores y confirmada por nosotros de los valores obtenidos con los controles normales, el estudio de la

actividad enzimática en células intactas de los padres del paciente (heterocigotos obligados) no es satisfactoria para la identificación de heterocigotos como tales. Sin embargo, el estudio de dicha actividad enzimática en homogenados de fibroblastos en cultivo sí parece ser un método efectivo para la identificación de los heterocigotos y posiblemente para la diferenciación de ellos entre sí, aunque esta última observación requerirá del estudio de un mayor número de casos con el objeto de comprobar su confiabilidad. De ser efectiva, permitirá un mejor estudio y comprensión de fenómenos de extraordinaria importancia para el ser humano tales como la heterogeneidad genética y la variabilidad humana.

El empleo de homogenados de fracciones enriquecidas con plaquetas tampoco resultó apropiado no sólo para la diferenciación de los heterocigotos entre sí, sino también para diferenciar al homocigoto mutante de los normales, debido a la probable ausencia de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada y la aparente decarboxilación inespecífica del sustrato por alguna otra deshidrogenasa.

Los métodos de análisis bioquímicos desarrollados durante los últimos 50 años han permitido avances espectaculares en el conocimiento y la comprensión de diversos procesos vitales. Gracias a ello, diferentes campos de estudio de las ciencias biológicas han descubierto facetas de la vida insospecha-

das hasta hace muy poco tiempo y han obligado frecuentemente - al investigador a replantear viejas concepciones y actitudes - filosóficas acerca del hombre en particular y de la vida en general. Una de las áreas que más ha contribuido a esta revolución científica ha sido, sin duda alguna, la biología molecu--lar, la cual, con su impresionante colección de descubrimientos ha venido a enriquecer enormemente a otras disciplinas afines como la genética.

Si bien la genética humana molecular ha contribuido con importantes descubrimientos al conocimiento general del -- hombre y de la vida, es evidente que queda mucho por hacer y - que los descubrimientos "revolucionarios" en este campo se encuentran todavía por realizar. Aunque es difícil imaginar que metodología permitirá llegar más efectivamente a ellos, es probable que los errores innatos del metabolismo sean uno de esos caminos. De ser así, quizá los investigadores del futuro los lleguen a considerar como parte del paradigma que gestó a la - genética humana molecular.



139-b

APENDICE  
(continúa)

Autor	Valores Reportados	
Dancis, <u>et al.</u> , New Eng. J. Med., 276: 84, 1967	C.P.M. por leucocitos intactos (4.0-5.0 ml de sangre)	
	sustrato: leucina-1- <sup>14</sup> C	valina-1- <sup>14</sup> C
	control 1:	2874
	2:	3576
	3:	2419
	4:	5744
	5:	2026
	6:	2072
	7:	1366
	8:	2133
	9:	4102
	10:	5194
	11:	2954
	12:	2618
	13:	2651
	14:	1324
	$\bar{X}$ :	2939.5
		2554
		3127
		2498
		5685
		2271
		2389
		2138
		2092
		3389
		4546
		3596
		2930
		2678
		1465
		2954.1
	pacientes (variedad intermitente)	
	1:	661
	2:	570
	3:	394
	4:	259
	padre	
	paciente 2:	897
	madre	
	paciente 2:	1753
	padre	
	paciente 4:	1127
	madre	
	paciente 4:	---
	variedad	
	clásica:	314
		138
		332
		76

APENDICE  
(continúa)

Autores	Valores Reportados
Schulman, <u>et al.</u> , Am. J. Med., 49: 118, 1970	<p>C.P.M./mg de proteína (fibroblastos intactos)</p> <p>sustrato: leucina-1-<sup>14</sup>C    valina-1-<sup>14</sup>C control</p> <p>A.B.:            24585            9778 A.S.:            23105            10072</p> <p>paciente (variedad intermedia)</p> <p>                  9956            4617</p> <p>padre:            40082            36766 madre:            83784            50667</p> <p>variedad clásica:            328            245</p>
Elsas, <u>et al.</u> , Metabolism, 23: 569, 1974	<p>C.P.M./mg de proteína (células amnióticas intactas)</p> <p>sustrato: leucina-1-<sup>14</sup>C    valina-1-<sup>14</sup>C controles (8): 99.9            102.6 paciente:            31.0            62.0</p>
Harkness, <u>et al.</u> , Ann. Clin. Biochem., 14: 146, 1977	<p>C.P.M./1 X 10<sup>6</sup> células amnióticas intactas</p> <p>sustrato: leucina-1-<sup>14</sup>C controles (13): 64.8 paciente:            27.3</p>

## REFERENCIAS

- Abdullah, Y.H., y Hamadah, K.: "Effect of ADP con PGE<sub>1</sub> formation in blood platelets from patients with depression, mania and schizophrenia". Br. J. Psychiat., 127: 591, 1975.
- Akerfeldt, S.A.: "Oxidation of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine by serum from patients with mental disease". Science, 125: 117, 1957.
- Anónimo: "Collective results of mass screening for inborn metabolic errors in eight European countries". Acta Paediat. Scand., 62: 413, 1973.
- Beadle, G.W.: "Genes and chemical reactions in Neurospora". Science, 129: 1715, 1959.
- Beadle, G.W.: "Biochemical genetics: some recollections", en "Phage and the origins of molecular biology", editado por Cairns, J., Stent, G.S., y Watson, J.D., Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology, p. 23, 1966.
- Belavady, B., Srikantia, S.G., y Gopalan, C.: "The effect of oral administration of leucine on the metabolism of tryptophan". Biochem. J., 87: 652, 1963.
- Belavady, B., Madhavan, T.V., y Gopalan, C.: "Production of nicotinic acid deficiency (blacktongue) in pups fed diets supplemented with leucine". Gastroenterology, 53: 749, 1967.
- Blass, J.P., Cederbaum, S.D., y Kark, R.A.P.: "Rapid diagnosis of pyruvate and ketoglutarate dehydrogenase deficiencies in platelet-enriched preparations from blood". Clin. Chim. Acta, 75: 21, 1977.
- Bowden, J.A., y Connelly, J.L.: "Branched chain alfa-keto acid metabolism. II. Evidence for the common identity of alfa-keto isocaproic acid and alfa-keto-beta-methyl valeric acid dehydrogenases". J. Biol. Chem., 243: 3526, 1968.

- Brown, M.S., y Goldstein, J.L.: "Receptor-mediated control of cholesterol metabolism". *Science*, 191: 150, 1976.
- Carrel, A.: "On the permanent life of tissues outside of the organism". *J. Exp. Med.* 15: 516, 1912.
- Cederbaum, S.D., Blass, J.P., Minkoff, N., Brown, W.J., Cotton, M.E., y Harris, S.H.: "Sensitivity to carbohydrate in a patient with familial intermittent lactic acidosis and pyruvate dehydrogenase deficiency". *Pediatr. Res.*, 10: 713, 1976.
- Connelly, J.L., Danner, D.J., y Bowden, J.A.: "Branched chain alfa-keto acid metabolism. I. Isolation, purification, and partial characterization of bovine liver alfa-keto isocaproic:alfa-keto-beta-methylvaleric acid dehydrogenase". *J. Biol. Chem.*, 243: 1198, 1968.
- Dancis, J., Levitz, M., Miller, S., y Westall, R.G.: "Maple syrup urine disease". *Br. Med. J.*, 1: 91, 1959.
- Dancis, J., Hutzler, J., y Levitz, M.: "Tissue distribution of branched chain keto acid decarboxylase". *Biochim. Biophys. Acta*, 52: 60, 1961.
- Dancis, J., Hutzler, J., y Levitz, M.: "The diagnosis of maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria) by the *in vitro* study of the peripheral leucocyte". *Pediatrics*, 32: 234, 1963 (a).
- Dancis, J., Jansen, V., Hutzler, J., y Levitz, M.: "The metabolism of leucine in tissue culture of skin fibroblasts of maple syrup urine disease". *Biochim. Biophys. Acta*, 77: 523, 1963 (b).
- Dancis, J., Hutzler, J., y Levitz, M.: "Detection of the heterozygote in maple syrup urine disease". *J. Pediatr.*, 66: 595, 1965.
- Dancis, J., Hutzler, J., Snyderman, S.E., y Cox, R.P.: "Enzyme activity in classical and variant forms of maple syrup urine disease". *J. Pediatr.*, 81: 312, 1972.
- Dancis, J., Hutzler, J., y Cox, R.P.: "Evaluation of amino-acid metabolism in maple syrup urine disease" en "Tissue culture, methods and applications", editado por Kruse, P.F. Jr., y Patterson, M.K. Jr., Academic Press, New York, p. 639, 1973.

- Dancis, J., Hutzler, J., y Cox, R.P.: "Maple syrup urine disease: branched-chain ketoacid decarboxylation in fibroblasts as measured with aminoacids and ketoacids". *Am. J. Hum. Genet.*, 29: 272, 1977.
- Dancis, J., y Levitz, M.: "Abnormalities of branched chain aminoacid metabolism", en "The metabolic basis of inherited disease", editado por Stanbury, J.B., Wyngaarden, J. B., y Fredrickson, D.S., McGraw-Hill Book Company, New York, cuarta edición, p. 399, 1978.
- Danner, D.J., y Bowden, J.A.: "Evidence for the separate identity of alfa-ketoisocaproic and alfa-keto isovaleric acid oxidative decarboxylases". *Fed. Proc.*, 25: 747, 1966.
- Danner, D.J., y Elsas, L.J.: "Subcellular distribution and cofactor function of human branched chain alfa-ketoacid dehydrogenase in normal and mutant cultured skin fibroblasts". *Biochem. Med.*, 13: 7, 1975.
- Danner, D.J., Lemmon, S.K., y Elsas, L.J.: "Substrate specificity and stabilization by thiamine pyrophosphate of rat liver branched chain alfa-ketoacid dehydrogenase". *Biochem. Med.* 19: 27, 1978.
- DeLuca, H.F., y Cohen, P.P.: "Preparation of Krebs-Ringer-Phosphate and Bicarbonate solutions", en "Manometric Techniques", editado por Umbreit, W.W., Burris, R.H., y Stauffer, J.F., Burgess, Minneapolis, Minnesota, p. 132, 1964.
- De Robertis, E.D.P., Saez, F.A., y de Robertis, E.M.F.: "Cell Biology", W.B. Saunders Company, sexta edición p. 203, 1975.
- Dobzhansky, T., Ayala, F.J., Stebbins, G.L., y Valentine, J.W.: "Evolution", W.H. Freeman and Company, p. 53, 1977.
- Dulbecco, R., y Vogt, M.: "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses". *J. Exp. Med.*, 99: 167, 1954.
- Eagle, H.: "Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture". *Science*, 122: 501, 1955.

- Eagle, H.: "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures".  
Science, 130: 432, 1959.
- Elsas, L.J., Priest, J.H., Wheeler, F.B., Danner, D.J., y  
Pask, B.A.: "Maple syrup urine disease: coenzyme  
function and prenatal monitoring". Metabolism, 23:  
569, 1974.
- Elsas, L.J., Danner, D.J., y Rogers, B.L.: "Effect of thia-  
mine on normal and mutant human branched-chain alfa-  
ketoacid dehydrogenase", en "Thiamine", editado por  
Gubler, C.J., Fujiwara, M., y Dreyfus, P.M., John  
Wiley & Sons, Inc., p. 335, 1976.
- Ganschow, R.E. y Paigen, K.: "Separate genes determining the  
structure and intracellular location of hepatic  
glucuronidase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58:  
938, 1967.
- Garrod, A.E.: "Inborn errors of metabolism (Croonian Lectures)  
en "Metabolic control and disease", editado por Bondy,  
P.K., y Rosenberg, L.E., W.B. Saunders and Company,  
octava edición, p. 75, 1980.
- Goedde, H.W., y Keller, W.: "Metabolic pathways in maple syrup  
urine disease", en "Aminoacid metabolism and genetic  
variation", editado por Nyhan, W.L., McGraw-Hill  
Company, p. 191, 1967.
- Gopalan, C., y Srikantia, S.G." "Leucine and pellagra". Lancet,  
1: 954, 1960.
- Ham, A.W.: "Tratado de Histología", Editorial Interamericana,  
sexta edición en español, p. 307, 1970.
- Harkness, R.A., Cockburn, F., Grant, M., Giles, M.M., Turner,  
T.L., y Darling, J.A.B.: "A new variety of maple  
syrup urine disease". Ann. Clin. Biochem., 14: 146,  
1977.
- Harris, H.: "Enzyme variation in man: some general aspects",  
en "Proceedings of the Third International Congress  
of Human Genetics", editado por Crow, J.F., y Neel,  
J.V., Johns Hopkins Press, p. 207, 1967.

- Harris, H., y Hopkinson, D.A.: "Average heterozygosity per locus in man: an estimate based on the incidence of polymorphism". *Ann. Hum. Genet. Lond.*, 36: 9, 1972.
- Haymond, M.W., Karl, I.E., Feigin, R.D., DeVivo, D., y Pagliara, A.S.: "Hypoglycemia and maple syrup urine disease: defective gluconeogenesis". *Pediatr. Res.* 7: 500, 1973.
- Hoffer, A., y Osmond, H.: "Treatment of schizophrenia with nicotinic acid. A ten year follow-up". *Acta Psychiat. Scand.*, 40: 171, 1964.
- Horrobin, D.F.: "Schizophrenia as a prostaglandin deficiency disease". *Lancet*, 1: 936, 1977.
- Horrobin, D.F.: "Schizophrenia: reconciliation of the dopamine, prostaglandine, and opioid concepts and the role of the pineal". *Lancet*, 1: 529, 1979.
- Horrobin, D.F.: "A singular solution for schizophrenia". *New Scientist*, 85: 642, 1980.
- Ichihara, A., y Koyama, E.: "Transaminase of branched chain aminoacids. I. Branched chain amino acids-alfa-ketoglutarate transaminase". *J. Biochem.*, 59: 160, 1966.
- Johnson, W.A., y Connelly, J.L.: "Cellular localization and characterization of bovine liver branched-chain alfa ketoacid dehydrogenases". *Biochem.*, 11: 1967, 1972.
- Kaladhar, M.: citado por Gopalan, C. y Rao, K.S.J. en "Pellagra and amino acid imbalance", en: "Vitamins and hormones. Advances in research and applications", Vol. 33, editado por Munson, P.L., Glover, J., Diczfalusy, E., y Olson, R.E., Academic Press, pp. 520-521, 1975.
- Kailman, F.J." "Heredity in health and mental disorders", W. W. Norton and Company, Inc., New York, 1953. Citado en "Psiquiatría clínica moderna", editado por Kolb, L.C., La Prensa Médica Mexicana, cuarta edición en español, p. 417, 1971.

- Kansaki, T., Hayakawa, T., Hamada, M., Fujoyoshi, Y., y Koike, M.: "Mammalian alfa-keto acid dehydrogenase complexes. IV. Substrate specificities and kinetic properties of the pig heart pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes". J. Biol. Chem., 244: 1183, 1969.
- Kiil, R., y Rokkones, T.: Late manifesting variant of branched chain ketoaciduria (maple syrup urine disease)". Acta Paediatr. Scand., 53: 356, 1964.
- Kirkman, H.N.: "Glucose-6-phosphate dehydrogenase". Adv. Hum. Genet., 2: 1, 1971.
- Krishnaswamy, K., y Murphy, P.S.: "Mental changes and platelet serotonin in plellagrins". Clin. Chim. Acta, 27: 301, 1970.
- Krooth, R.S., y Weinberg, A.N.: "Studies on cell lines developed from the tissue of patients with galactosemia". J. Exp. Med., 113: 1155, 1961.
- LaDu, B.N., Zannoni, V.G., Laster, L., y Seegmiller, J.E.: "The nature of the defect in tyrosine metabolism in alcaptonuria". J. Biol. Chem., 230: 251, 1958.
- Linneweh, F., y Socher, H.: "Uber dan einflut diatetiseher trophylaxie auf die myelogenese der leucinasa". Klin Wochensehr., 43: 926, 1965.
- Lusis, A., y Paigen, K.: "Mechanisms involved in the intracellular localization of mouse glucuronidase". en "Isozymes: current topics in biological and medical research", editado por Adan R. Liss, Inc., p. 63, 1977.
- McKnight, M.T., y Spence, M.W.: "Attempted detection for heterozygotes in maple syrup urine disease". Clin. Genet., 3: 458, 1972.
- Menkes, J.H., Hurst, P.L., y Craig, J.M.: "New syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance". Pediatrics, 14: 462, 1954.

- Menkes, J.H.: "Maple syrup urine disease: isolation and identification of organic acids in the urine". *Pediatrics*, 23: 348, 1959.
- Montiel, F., Carnevale, A., Villarreal, M.L., y Velázquez, A.: "Un caso de enfermedad de orina de jarabe de arce: diagnóstico y manejo", en "V Congreso Internacional de Genética Humana", editado por Armendares, S., y Iisker, R., *Excerpta Medica*, p. 42, 1976.
- Montiel, F., Velázquez, A., Villarreal, M.L., y Carnevale, A.: "Leucine-derived carbon dioxide production by cultured fibroblasts from individuals heterozygous for the intermediate variant of maple syrup urine disease". *Rev. Invest. Clín. (Méx.)*, 30: 99, 1978.
- Montiel, F., Velázquez, A., Villarreal, M.L., y Carnevale, A.: "Studies on a patient with intermediate form of maple syrup urine disease (MSUD) and from his parents", en "XIV International Congress of Genetics. Contributed Paper Sessions", Publishing Office Nauka, Moscow, p. 352, 1978.
- Montiel, F., Rangel, R., y Velázquez, A.: "Branched-chain keto-acid dehydrogenase in fibroblasts and platelets from an MSUD patient and from his parents". *Rev. Invest. Clín. (Méx.)*, 32: 121, 1980.
- Morris, M.D., Lewis, B.D., Doolan, P.D. y Harper, H.A.: "Clinical and biochemical observations on an apparently non-fatal variant of branched-chain ketoaciduria (maple syrup urine disease)". *Pediatrics*, 28: 918, 1961.
- Naylor, E.W. y Guthrie, R.: "Newborn screening for maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria)". *Pediatrics*, 61: 262, 1978.
- Osmond, H., y Hoffer, A.: "Massive niacine treatment in schizophrenia. Review of a nine year study". *Lancet*, 1: 316, 1962.
- Oyama, V.I., y Eagle, H.: "Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteu)". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 91: 305, 1956.

- Pauling, L.: "Orthomolecular psychiatry". Science, 160: 265, 1968.
- Petit, F.H., Yeaman, S.J., y Reed, L.J.: "Purification and characterization of branched chain alfa-ketoacid dehydrogenase complex of bovine kidney". Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 4881, 1978.
- Prensky, A.L., y Moser, H.W.: "Brain lipids, protolipids, and free amino acids in maple syrup urine disease". J. Neurochem., 13: 863, 1966.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J., y Fisher, H.W.: "Clonal growth in vitro of human cells with fibroblast morphology. Comparison of growth and genetic characteristics of single epithelioid and fibroblast-like cells from a variety of human organs". J. Exp. Med., 106: 145, 1957.
- Pueschel, S.M., Bresnan, M.J., Shih, V.E., y Levy, H.L.: "Thiamine-responsive intermittent branched chain ketoaciduria". J. Pediatr., 94: 628, 1979.
- Reed, L.J.: "The chemistry and function of lipoic acid". Advan. Enzymol., 18 319, 1957.
- Rode, E.W., Coll, K.E., y Williamson, J.R.: "Effects of branched chain alfa-ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. II. Interactions with gluconeogenesis and urea synthesis". J. Biol. Chem., 254: 11521, 1979.
- Rosenberg, L.E.: "Inborn errors of metabolism", en "Metabolic control and disease", editado por Bondy, P.K., y Rosenberg, L.E., W.B. Saunders Company, octava edición, p. 73, 1980.
- Rüdiger, H.W., Lagenbeck, U., y Goedde, H.W.: "A simplified method for the preparation of  $^{14}\text{C}$ -labelled branched-chain alfa-oxo acids". Biochem. J., 126: 445, 1972.
- Schulman, J.D., Lustberg, T.J., Kennedy, J.L., Museles, M., y Seegmiller, J.E.: "A new variant of maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria)". Am. J. Med., 49: 118, 1970.

- Scriver, C.R., Clow, C.L., Mackenzie, S., y Delvin, E.: "Thiamine-responsive maple syrup urine disease". *Lancet*, 1: 310, 1971.
- Shaw, K.N.F., Gutenstein, M., Jacobs, E.E., y Blaskovics, J.C. "Biochemical screening and monitoring of patients with phenylketonuria and variant forms of hyperphenylalaninemia", en "Phenylketonuria and some other inborn errors of aminoacid metabolism", editado por Bickel, H., Hudson, F.P. y Wollf, L.I., Georg Thieme Verlag (ed.), p. 163, 1971.
- Shin, V.E.: "Laboratory techniques for the detection of hereditary metabolic disorders". C.R.C. Press, p. 43, 1973.
- Silberberg, D.H.: "Maple syrup urine disease metabolites studied in cerebellum cultures". *J. Neurochem.*, 16: 1141, 1969.
- Snyderman, S.E., Norton, P.M., Roitman, E., y Holt, L.E., Jr.: "Maple syrup urine disease, with particular references to dietotherapy". *Pediatrics*, 34: 454, 1964.
- Spiegel, M.R.: "Estadística", Libros McGraw-Hill de México, -- S.A. de C.V., p. 73, 1970.
- Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., y Fredrickson, D.S.: "The metabolic basis of inherited disease", McGraw-Hill Book Company, fourth edition, 1978.
- Stern, C.: "Principles of human genetics", W.H. Freeman and Company, third edition, 1973.
- Sydenstricker, V.P., y Cleckley, H.M.: "The effect of nicotinic acid in stupor, lethargy and various other psychiatric disorders". *Amer. J. Psychiatry*, 98: 83, 1941.
- Taylor, J., Robinson, B.H., y Sherwood, W.G.: "A defect in branched chain amino acid metabolism in a patient with congenital lactic acidosis due to dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency". *Pediat. Res.*, 12: 60, 1978.
- Taylor, R.T., y Jenkins, W.T.: "Leucine aminotransferase. II. Purification and characterization". *J. Biol. Chem.*, 241: 4396, 1966.

- Thomas, G.H., y Howell, R.R.: "Selected screening tests for genetic metabolic diseases", Year Book Medical Publishers, Inc., p. 19, 1973.
- Wendel, U., Rüdiger, H.W., Passarge, E., y Mikkelsen, M.: "Maple syrup urine disease: rapid prenatal diagnosis by enzyme assay". Humangenetik, 19: 127, 1973.
- Wendel, U., Wentrup, H., y Rüdiger, H.W.: "Maple syrup urine disease: analysis of branched chain ketoacid decarboxylation in cultured fibroblasts". Pediat. Res., 9: 708, 1975.
- Westall, R.G., Dancis, J., y Miller, S.: "Maple syrup urine disease". Am. J. Dis. Child., 94: 571, 1957.
- Wiener, J.S., y Hope, J.M.: "Cerebral manifestations of vitamin B<sub>12</sub> deficiency". J.A.M.A., 170: 1038, 1959.
- Williamson, J.R., Rode, E.W., y Coll, K.E.: "Effects of branched chain alfa ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. I. Regulation of branched chain alfa-ketoacid metabolism". J. Biol. Chem., 254: 11511, 1979.
- Wolhueter, R.M., y Harper, A.E.: "Coinduction of rat liver branched-chain alfa-keto acid dehydrogenase activities". J. Biol. Chem., 245: 2391, 1970.
- Yoshida, A.: "Aminoacid substitution (histidine to tyrosine) in a glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD Hektoen) associated with overproduction". J. Mol. Biol., 52: 483, 1970.
- Yuwiler, A., y Geller, E.: "Serotonin depletion by dietary leucine". Nature, 208: 83, 1965.

Este trabajo fue realizado en el  
Laboratorio de Biología Celular  
del Instituto de Investigaciones  
Biomédicas de la Universidad Na-  
cional Autónoma de México.