

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

**ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA U.N.A.M.**

1
29

**IMPORTANCIA QUIMICA, BIOQUIMICA
Y CLINICA DE LOS AMINOACIDOS
PROTEINICOS Y NO PROTEINICOS**

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
SILVIA ACEVEDO MUÑIZ
ABIGAIL GALLEGOS GARAY

ASESOR DE TESIS:
DR. EN C. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

MÉXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. José Domingo Méndez F.

A usted, nuestro más sincero agradecimiento por aceptar dirigir la presente tesis que como sabe, representa la culminación de una serie de esfuerzos, logros, dedicación y sacrificios a lo largo del desarrollo profesional de todo ser humano. Gracias por el tiempo que siempre tuvo para efectuar correcciones, revisar - cada parte del trabajo y pulirlo hasta alcanzar el objetivo pro puesto al inicio del mismo.

Dra. Marcela Vela.

Gracias por todo el apoyo recibido, tanto a nivel bibliográfico como personal, en el desarrollo de la tesis presente. Las apor taciones en el campo de enfermedades provocadas por errores innatos en el metabolismo, permitieron actualizar y completar satisfactoriamente este trabajo. De igual forma agradecemos al Instituto Nacional de Pediatría, especialmente a la Unidad de Genética de la Nutrición las facilidades prestadas.

A cada uno de nuestros revisores, Dr. Mariano Ramírez D., Q.F.B. Leticia Linares E., Q.F.B. Ma. de Jesús Ramírez. P. y Q.F.B. Angelina Ochoa I.; gracias por su apoyo, enseñanzas, conocimien tos y por compartir con nosotros el logro y la dicha de ser pro fesionistas responsables y comprometidos con nuestro tiempo.

A Dios.

Gracias Señor por guiar mi camino y mantenerlo siempre pleno en salud, alegría, satisfacciones, esperanza, y amor. Gracias por convertir en realidad una más de mis metas y por darme la dicha de cosechar aún las semillas que olvidé sembrar.

Mamá.

Con todo mi amor te ofrezco los esfuerzos, tiempo y dedicación depositados en este trabajo que refleja lo que con tanto sacrificio y amor has construido de mí .

Papá.

Para ti es igualmente este trabajo. Gracias por ser siempre el pilar de la familia y por demostrarme con hechos el amor que me tienes. Te quiero mucho.

Mamá y Papá .

Gracias por ser sinónimos de amor, comprensión, apoyo, unión , dedicación, paciencia y sacrificio durante toda mi vida .

Luli.

Gracias por demostrarme con tu apoyo, cariño, nobleza, alegría y paciencia, que la palabra hermano, vá mas allá de lo que en esencia significa .

ABIGAIL GALLEGOS GARAY

-A ti Señor, por llevarme de la mano y conducirme, por darme la oportunidad de lograr esta meta, por iluminarme y darme siempre lo mejor.

A ti mamá, por tu cariño, dedicación, comprensión, consejos, y sacrificios; y a Paco, pues sin el apoyo de ambos no hubiera podido llegar a cumplir una de mis principales metas. Gracias, y con todo mi amor les dedico mis esfuerzos y logros.

A ti papá, con mucho cariño, aunque físicamente estás ausente, yo sé que siempre me has acompañado y he recibido tus bendiciones; comparto contigo este logro.

A ti Jaime, por apoyarme durante todo el tiempo de estudio, por entenderme y sacrificar tiempo de nosotros por mi carrera, Gracias por tu amor y consejos. Te amo.

A mis abuelitos por su cariño, apoyo, preocupaciones, oraciones y consejos, los quiero mucho.

A mi familia querida, especialmente a mis tías por todo el apoyo, cariño, confianza, consejos, y ayuda durante toda mi carrera .

A mi nueva y querida familia, por su cariño, apoyo, aliento, y por aceptarme como parte de ustedes.

A todos mis estimados amigos y amigas porque han compartido conmigo mis esfuerzos, alegrías, tristezas, logros y fracasos, porque me han regalado parte de sí mismos y me han alentado siempre.

A todos mis maestros por compartir conmigo sus conocimientos , por su paciencia y dedicación, por darme lo mejor de ustedes mismos. Siempre los recordaré con cariño.

SILVIA ACEVEDO MUÑIZ .

- I N D I C E G E N E R A L -

<u>Capítulo:</u>	<u>Página:</u>
I. Introducción	1
II. Clasificación.	6
III. Propiedades físicas y químicas	16
IV. Métodos cromatográficos y electroforéticos para el análisis de aminoácidos	27
V. Errores innatos del metabolismo de aminoácidos: aminoacidopatías	64
VI. Diagnóstico clínico de aminoacidopatías.	82
VII. Abuso en el consumo de aminoácidos y sus consecuencias metabólicas.	90
VIII. Conclusiones	132
IX. Bibliografías.	133

- I N D I C E E S P E C I F I C O -

<u>Capítulo; Tema; Subtema:</u>	<u>Página:</u>
I. Introducción	1
II. Clasificación.	6
2.1 Clasificación química.	6
2.2 Clasificación biológica.	10
2.2.1 Aminoácidos esenciales y no esenciales	10
2.2.2 Aminoácidos proteínicos poco frecuentes.	11
2.2.3 Aminoácidos no proteínicos	13
III. Propiedades físicas y químicas	16
3.1 Propiedades físicas.	16
3.1.1 Solubilidad.	16
3.1.2 Absorción de luz	16
3.1.3 Actividad óptica	17
3.2 Propiedades químicas	19
3.2.1 Propiedades ácido-base	19
3.2.2 Principales reacciones químicas.	24
IV. Métodos cromatográficos y electroforéticos para el análisis de aminoácidos	27
4.1 Cromatografía en capa fina	27
4.1.1 Cromatografía en capa fina de alta resolución HPTLC	31
4.1.2 Separación enantiomérica de aminoácidos por cromatografía en capa fina	31
4.1.3 Detección y determinación cuantitativa	33

4.2	Formación de derivados de aminoácidos.	35
4.3	Cromatografía en papel	37
4.4	Cromatografía de intercambio iónico.	38
4.5	Electroforesis	42
4.5.1	Electroforesis capilar de alta resolución.	43
4.5.2	Electroforesis capilar en gel y separación enantiomérica de aminoácidos	45
4.6	Cromatografía de gases	46
4.6.1	Formación de derivados en cromatografía de gases; Reactivos de elección para ami- noácidos	49
4.6.2	Separación enantiomérica de aminoácidos.	52
4.7	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	53
4.7.1	Formación de derivados	57
4.7.2	Separación enantiomérica	60
4.7.3	Análisis de aminoácidos aromáticos	61
4.7.4	HPLC y espectrometría de barrido rápido.	62
V.	Errores innatos del metabolismo de aminoácidos:	
	aminoacidopatías	64
5.1	Fenilcetonuria	66
5.2	Enfermedad de orina en jarabe de maple (Arce).	69
5.3	Homocistinuria	74
5.4	Compendio de aminoacidopatías.	76
VI.	Diagnóstico clínico de aminoacidopatías.	82
6.1	Introducción	82
6.2	Diagnóstico de fenilcetonuria (PKU).	86
6.3	Diagnóstico de enfermedad de orina en jarabe de maple (EOJM)	87
6.4	Diagnóstico de homocistinuria.	89

VII.	Abuso en el consumo de aminoácidos y sus consecuencias metabólicas.	90
	7.1 Introducción	90
	7.2 Toxicidad, antagonismo y desbalance de aminoácidos	92
	7.3 Toxicidad y efectos adversos en el hombre.	98
	7.4 Toxicidad de aminoácidos individuales.	99
	7.4.1 Aminoácidos aromáticos	99
	7.4.2 Aminoácidos azufrados.	110
	7.4.3 Otros aminoácidos esenciales	116
	7.4.4 Aminoácidos no esenciales.	119
	7.4.5 D-Aminoácidos.	122
	7.5 Antagonismo de aminoácidos	126
	7.5.1 Aminoácidos de cadena ramificada	126
	7.5.2 Antagonismo lisina-arginina.	129
VIII.	Conclusiones	132
IX.	Bibliografías.	133

Capítulo I

Introducción

I. INTRODUCCION

Químicamente, los aminoácidos (a.á.) se definen como compuestos biológicos, orgánicos, constituídos por dos grupos funcionales: amino y carboxilo libres (excepto la prolina), los cuales difieren entre sí en sus cadenas laterales R y cuya fórmula general se presenta en la Fig. 1. (1,2):

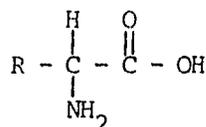


Fig. 1. Fórmula general de los α -a.á.

Se les conoce más apropiadamente como α -aminoácidos, debido a que ambos grupos funcionales están unidos al mismo átomo de carbono alfa, excepto la prolina. El primer a.á. aislado de una proteína hidrolizada fue la Glicina (antes conocida como Glicocola) se obtuvo en 1820 a partir de la gelatina, mientras que la Treonina se aisló hasta 1935 a partir de un hidrolizado de fibrina (3).

Centrándonos en la estructura de los a.á. podemos decir que éstos difieren entre sí en el grupo que tienen sustituido en el carbono alfa, el cual les confiere diferentes propiedades químicas.

Los a.á. "unidades monoméricas de las proteínas"(1), en las cuales determinan sus relaciones espaciales y propiedades, son moléculas bioquímicas que desempeñan funciones celulares de vital importancia. Estos son responsables de reacciones metabólicas específicas debido a sus propiedades. Además de su función en las proteínas, el metabolismo de a.a. origina muchos compuestos de importancia biomédica (1,3).

Los L-a.á. solamente se encuentran formando parte de las proteínas, mientras que los D-a.á. constituyen muchos otros compuestos como son: antibióticos (valinomicina, actinomicina D, gramicidina S), constituyen paredes celulares bacterianas funcionando como defensa contra las peptidasas (enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos), que muchos organismos emplean para digerir paredes celulares bacterianas (1).

Gracias a la biodiversidad se han encontrado cerca de 250 diferentes aminoácidos tanto en plantas como en hongos (6). Para la mayor parte, sus funciones biológicas no han sido aclaradas, pero dado que muchos son tóxicos se cree que pueden tener una función de protección (1). La presencia de estos a.á. es de grán interés bioquímico, sobre todo en cuanto a su importancia fisiológica, su biosíntesis y metabolismo (4).

Los a.á. y sus derivados funcionan con frecuencia como mensajeros químicos en la comunicación entre células. Estos son: (1,3,5,7)

***ACIDO γ -AMINOBTIRICO (GABA):**

Es el producto de la carboxilación del glutamato y funciona como principal inhibidor de los neurotransmisores cerebrales.

***GLICINA:**

Funciona transportando los impulsos nerviosos. Al unirse con el acetato, forma la hemoglobina y al unirse con la succinil-CoA origina las porfirinas.

***DOPAMINA:**

Es el producto de la descarboxilación de la tirosina; funciona como neurotransmisor y su deficiencia ocasiona mal de Parkinson.

***HISTAMINA:**

Se genera por la descarboxilación de la histidina. Es un potente mediador local de las reacciones alérgicas y de la secreción ácida del estómago.

***SEROIONINA:**

Resulta de la hidroxilación del triptófano y subsecuente descarboxilación, a serotonina. Es la responsable de las contracciones musculares.

***EPINEFRINA:**

Se origina de su precursores, la norepinefrina, que sufre metilación por la S-adenosil-metionina, para formar epinefrina. Esta activa en el músculo a la adenilato ciclase la cual estimula la ruptura de glucógeno.

***TIROXINA:**

Es una hormona tiroidea, producto de la tirosina; contiene yodo y estimula el metabolismo en vertebrados.

***3-MONOYODOTIROSINA:**

Funciona como precursora de las hormonas tiroideas.

***DOPA:**

Es el precursor de la melanina la cual es responsable de la pigmentación de ojos, piel y pelo.

***S-ADENOSILMETIONINA (SAM):**

Se forma a partir de la metionina y produce homocisteína que al unirse con la serina, se obtiene cistationina y, finalmente cisteína y α -cetobutirato. Es un reactivo biológico metilador o donador de grupos propilamina, como en el caso de la síntesis de poliaminas.

***N-FORMILMETIONINA:**

Es el residuo N-terminal de las proteínas procarióticas.

***ACIDO γ -CARBOXIGLUTAMICO:**

Es un constituyente de varias proteínas involucradas en la coagulación de la sangre.

*** β -ALANINA:**

Forma parte de la coenzima-A y de la vitamina pantoteína.

***ACIDO β -AMINOISOBUTIRICO:**

Producto final del catabolismo de las pirimidinas. Está presente en la orina de algunas personas.

***ACIDO CISTEINSULFINICO:**

Es el intermediario en el catabolismo de la cisteína.

***DESMOSINA E ISODESMOSINA:**

Componentes estructurales de la elastina, que a su vez están formadas por residuos de lisina.

***AZOASERINA Y β -CIANOALANINA:**

Ambos son antibióticos de uso médico y poseen estructuras poco comunes.

***4-HIDROXIPROLINA y 5-HIDROXILISINA:**

Son residuos importantes que constituyen la colágena, proteína fibrosa de más importancia en los mamíferos.

***HIDROXIPROLINA:**

Forma extensiva de paredes celulares de las plantas superiores (se encuentra en un 33% en las proteínas).

***TAURINA:**

Se encuentra en la bilis combinada con los ácidos biliares.

***ORNITINA:**

Intermediario en la biosíntesis de la urea y en el metabolismo de la treonina, aspartato y metionina.

***CITRULINA:**

Al igual que la ornitina, es un intermediario en la biosíntesis de la urea.

***HOMOCISTEINA:**

Intermediario importante en la síntesis de metionina.

***HOMOCISTINA:**

Intermediario en el metabolismo de varios aminoácidos.

***CISTEINA:**

Al unirse con otra molécula de cisteína forma la cistina.

Además de lo ya mencionado los 20 aminoácidos esenciales son los encargados de codificar para las bases del código genético (1).

Por todo lo anterior consideramos importante aportar en esta investigación todo lo referente a los a.á. como: clasificación, propiedades, métodos de análisis, errores innatos de su metabolismo, diagnóstico clínico de dichos errores innatos y el abuso en su consumo, que se describirá en los capítulos subsecuentes.

Capítulo II

Clasificación

II. CLASIFICACION:

Los aminoácidos se clasifican en primer término en base a su presencia o ausencia en las proteínas en: proteínicos y no proteínicos respectivamente.

2.1 CLASIFICACION QUIMICA (AMINOACIDOS PROTEINICOS)

Todas las proteínas están constituidas por 20 aminoácidos (proteínicos) de los cuales existen diferentes clasificaciones químicas, sin embargo la que consideramos la más adecuada debido a su simplicidad es la siguiente (1):

AMINOACIDOS CON CADENAS LATERALES NO POLARES:

<u>Nombre:</u>	<u>Abreviaturas:</u>	<u>Fórmula Estructural:</u>
Glicina	Gly G	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Alanina	Ala A	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Valina	Val V	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Leucina	Leu L	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} \\ \quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$

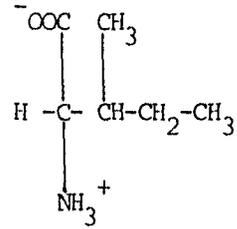
Nombre:

Abreviaturas:

Fórmula Estructural:

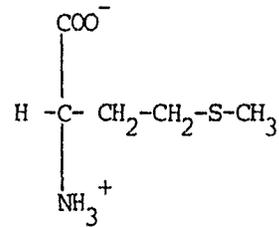
Isoleucina

Ile I



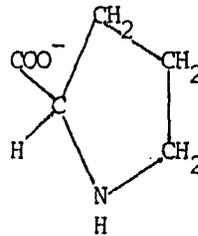
Metionina

Met M



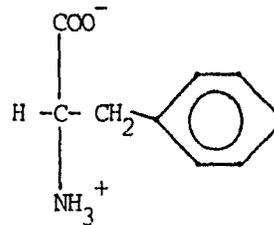
Prolina

Pro P



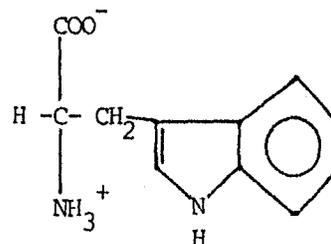
Fenilalanina

Phe F



Triptofano

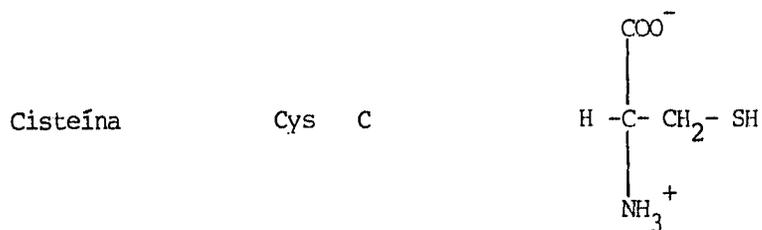
Trp W



AMINOACIDOS CON CADENAS LATERALES POLARES SIN CARGA:

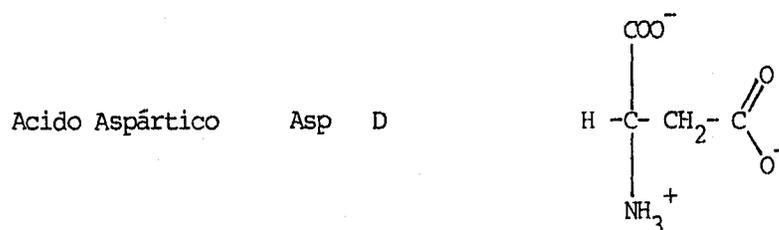
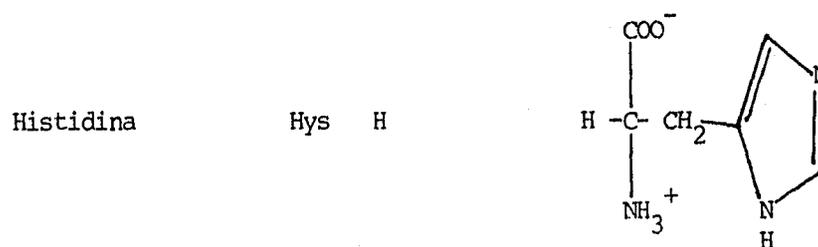
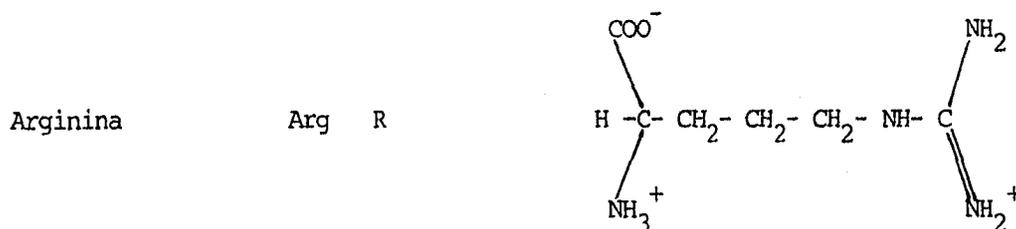
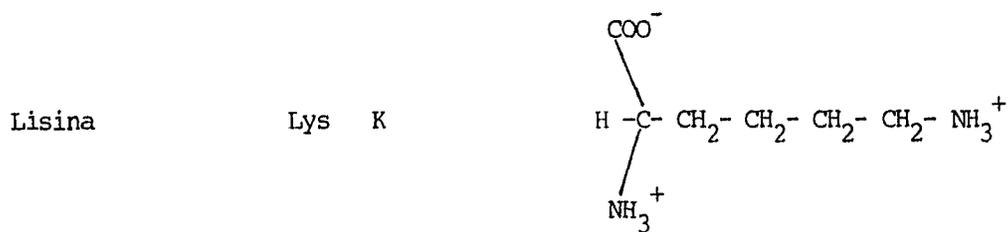
<u>Nombre:</u>	<u>Abreviaturas:</u>	<u>Fórmula Estructural:</u>
Serina	Ser S	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{OH} \\ \\ +\text{NH}_3 \end{array} $
Treonina	Thr T	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \quad \\ +\text{NH}_3 \quad \text{OH} \end{array} $
Asparagina	Asn N	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} \\ \quad \quad \quad // \quad \backslash \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array} $
Glutamina	Gln Q	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} \\ \quad \quad \quad \quad \quad // \quad \backslash \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \quad \quad \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array} $
Tirosina	Tyr Y	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $

Nombre: Abreviaturas: Fórmula Estructural:



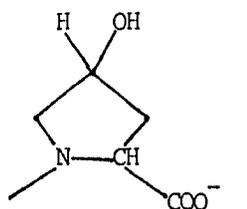
AMINOACIDOS CON CADENAS LATERALES POLARES CON CARGA:

Nombre: Abreviaturas: Fórmula Estructural:

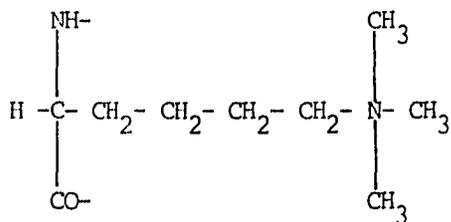


2.2.2 AMINOACIDOS PROTEINICOS POCO FRECUENTES:

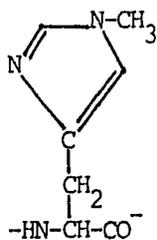
Además de los 20 aminoácidos proteínicos comunes, existen algunos otros que son poco frecuentes; éstos son los siguientes (1,3,4,5,6):



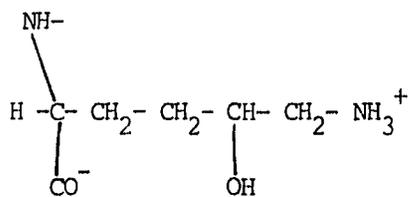
4-Hidroxiprolina



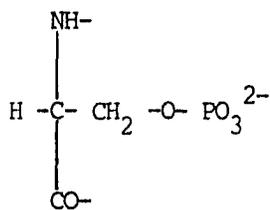
-N,N,N- Trimetil lisina



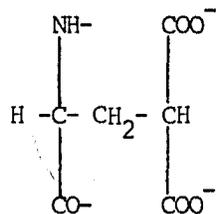
3-Metil histidina



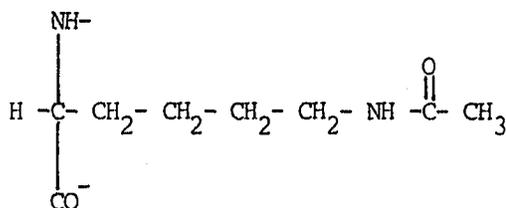
5-Hidroxilisina



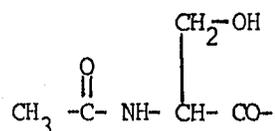
O-Fosfoserina



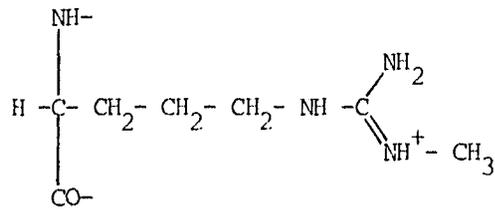
γ'-Carboxiglutamato



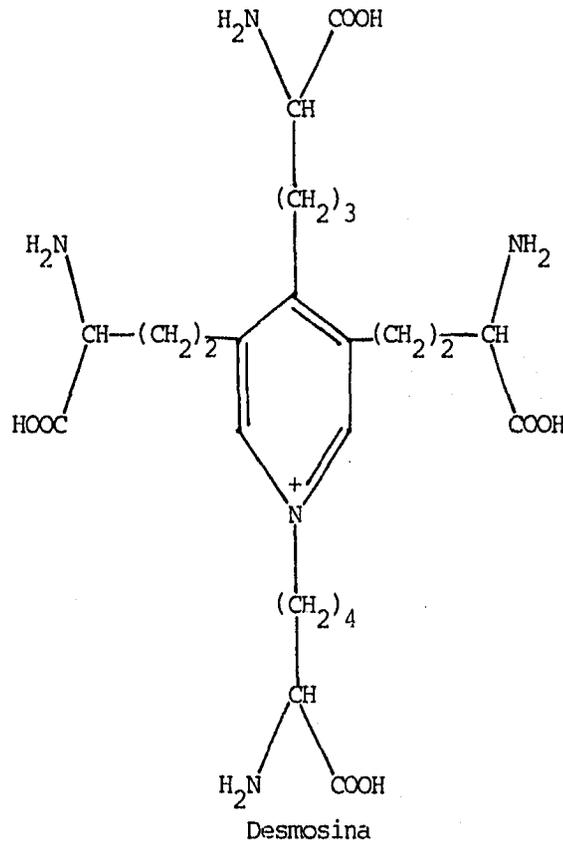
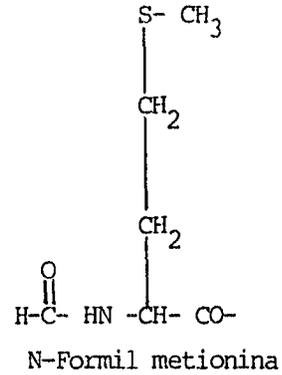
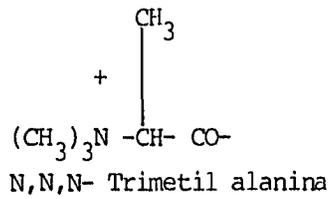
ε-N-Acetil lisina

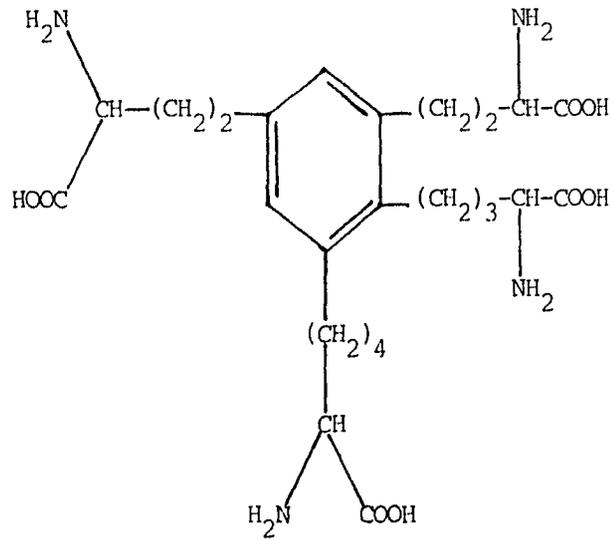


N-Acetil serina



ω -N-Metil arginina



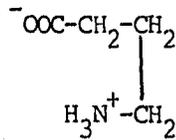


Isodesmosina

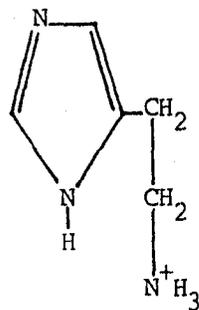
2.2.3 AMINOACIDOS NO PROTEINICOS

Además de los veinte a.á. proteínicos comunes y de varios otros poco frecuentes en las proteínas, se conocen muchos mas no proteínicos, que se encuentran en diferentes células y tejidos en forma libre o combinada pero nunca en las proteínas. La mayor parte de ellos son derivados de los alfa aminoácidos, hallados en las proteínas, pero también se conocen beta, gama y delta a.á..

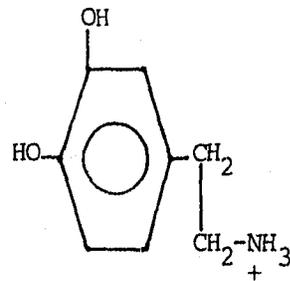
Estos a.á. no proteínicos son los siguientes:



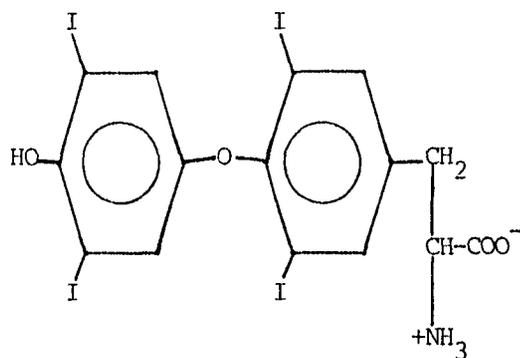
Acido Gama aminobutírico
(GABA)



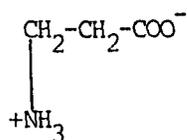
Histamina



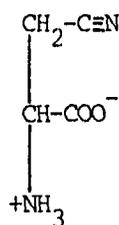
Dopamina



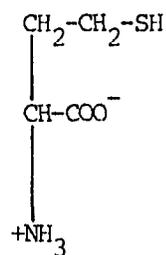
Tirosina



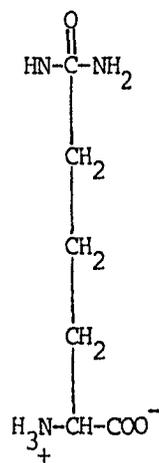
β-Alanina



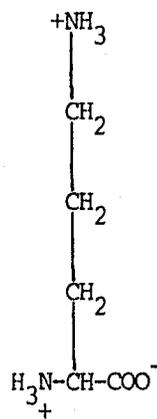
β-Cianoalanina



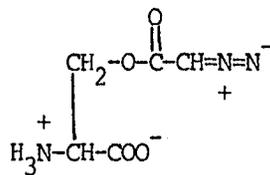
Homocisteina



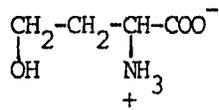
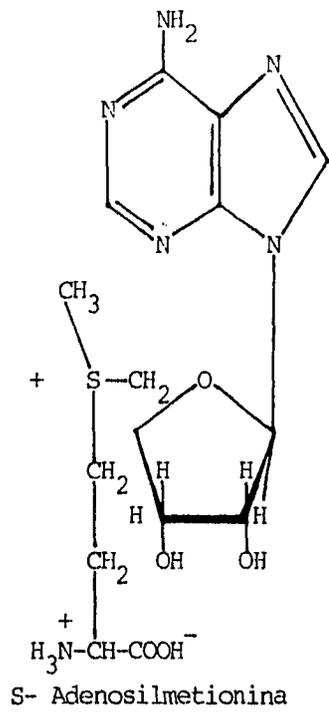
Citrulina



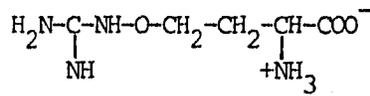
Ornitina



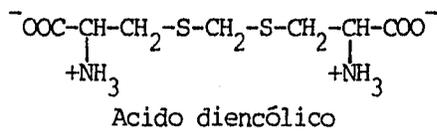
Azaserina



Homoserina



Canavalina



Capítulo III

Propiedades físicas y químicas

III. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

3.1 PROPIEDADES FISICAS:

Todos los a.á. comunes que forman parte de las proteínas son sólidos cristalinos no volátiles que funden con descomposición a temperaturas relativamente elevadas (superiores a 200°C), lo que refleja la presencia de grupos cargados (fuerzas iónicas que mantienen la red cristalina)(4).

En general, los a.á. son estables en soluciones acuosas que además pueden someterse al calor de una autoclave a temperaturas de 100 a 120°C por períodos que varían entre 0.5 y 2 horas sin que se observe una descomposición apreciable. La Gln y el Glu son la excepción, ya que ambos se ciclizan cuando son calentados en solución acuosa (4).

3.1.1 SOLUBILIDAD:

Los a.á. a diferencia de los ácidos carboxílicos y las aminas, son insolubles en disolventes no polares como benceno, éter o hexano; son apreciablemente solubles en agua. La mayoría de los a.a. son muy poco solubles en etanol absoluto, sin embargo constantemente a bajas concentraciones (de 0.0003 a 0.002 M), ciertos a.a. pueden detectarse en soluciones etanólicas por medio de la reacción con ninhidrina. En general los clorhidratos de los a.a. neutros y los clorhidratos de los a.a. básicos son más solubles de lo que son los correspondientes a.a. libres. Por su parte las sales sódicas de los a.a. se disuelven mejor en agua y etanol, que los a.a. libres correspondientes. La presencia de sales afecta la solubilidad de un a.a. en agua; ciertos a.a., al igual que las proteínas, pueden "salarse" en la solución. Por ejemplo: la presencia de sulfato de amonio incrementa la solubilidad de la cistina; conforme la fuerza iónica se ve incrementada, la cistina es precipitada de la solución (4,5,8).

3.1.2 ABSORCION DE LUZ:

Los a.á. no absorben la luz visible, es decir, son incoloros y, con excepción de los aromáticos (Trp, Tyr, Phe, His) no absorben la luz UV de una longitud de onda mayor a 240 nm (5).

3.1.3 ACTIVIDAD OPTICA:

Una de las propiedades físicas de mayor importancia en los a.á. es su actividad óptica. Todos ellos con excepción de la Gly son ópticamente activos (O.A.), esto es, hacen girar el plano de luz polarizada (1).

"Las moléculas O.A. tienen una asimetría tal que nos son superponibles a su imagen especular, en la misma forma que la mano izquierda no es superponible a su imagen especular, la mano derecha" (8). Esta situación es característica de sustancias que contienen átomos de carbono tetraédricos con cuatro sustituyentes diferentes, como se puede apreciar en la Fig. 2. en el caso de los a.a.:

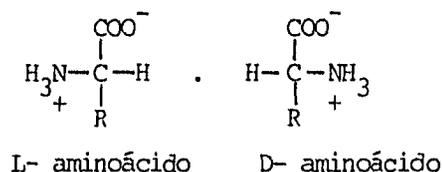


Fig. 2. α - a.á. enantioméricos (Presencia de centro quiral).

Los átomos centrales en estas constelaciones atómicas son conocidos como centros asimétricos o centros quirales. Las moléculas no superponibles a su imagen especular se denominan enantiómeros y son física y químicamente indistinguibles por la mayoría de los análisis. Únicamente cuando se les prueba asimetría, ya sea determinando su rotación óptica, o mediante reactivos que también contengan centros quirales, pueden distinguirse y/o manipularse (1).

Al igual que para toda molécula O.A., los estereoisómeros de los a.á. se clasifican de acuerdo a tres sistemas de nomenclatura (1):

1.- CLASIFICACION OPERACIONAL:

Divide a las moléculas en **dextrorrotatorias**, designadas por el símbolo (+), y **levorrotatorias**, designadas como (-), dependiendo si giran el plano de luz polarizada conforme a las manecillas del reloj, o en sentido contrario. Ello se determina a través del polarímetro a partir del cual puede obtenerse una medida cuantitativa de la A.O.;

$$\text{rotación específica } [\alpha]_D^{25} = \frac{\text{Rotación observada (grados)}}{\text{Long. celda (dm) X Concentración (g/cm}^3)} \quad (8).$$

Los enantiómeros de los a.á. dextrorrotatorios presentan valores de rotación específica de la misma magnitud pero de signo opuesto. La naturaleza ácido-base de los aminoácidos influye en la obtención de estos valores dependiendo del pH de la solución (1).

2.- CONVENCION DE FISHER:

Su ventaja respecto al sistema anterior radica en que provee la configuración absoluta (arreglo espacial) de los grupos químicos alrededor del centro quiral basándose en la configuración del gliceraldehído (Véase Fig. 3). Para los α -a.á., el orden de los grupos amino, carboxilo, -R y -H, en relación al $C\alpha$ está relacionada a la del hidroxilo, aldehído, $-CH_2-OH$, y -H, respectivamente, del gliceraldehído. Este método permite describir las configuraciones de los a.á. sin referirse a sus rotaciones específicas. "Todos los α -a.á. derivados de proteínas tienen la configuración estereoquímica L" (1,3).



Fig. 3. Configuración del L-gliceraldehído y de los L- α - a.á..

3.- EL SISTEMA DE CAHN-INGOLD-PRELOG:

Se emplea especialmente en el caso de las moléculas con más de un centro asimétrico. En este sistema los cuatro grupos que rodean al centro quiral están acomodados con un esquema de prioridad específica: "los átomos de elevado peso molecular que están unidos a un centro quiral se ubican por encima de aquellos de bajo número atómico". En la Fig. 4 se muestra el orden de prioridad de algunos grupos funcionales comunes (1,8).



Fig. 4. Orden de prioridad de ciertos grupos funcionales de acuerdo al Sistema de Cahn-Ingold-Prelog.

CONSIDERACIONES ESTEREOQUIMICAS IMPORTANTES: (4)

- a) La hidrólisis alcalina de proteínas rinde a.á. ópticamente inactivos (O.I.A.).
- b) Estos tienen solubilidades diferentes a las de los aminoácidos O.A. obtenidos por hidrólisis ácida.
- c) Cuando un aminoácido O.I.A. se incorpora al medio de cultivo de una cepa, se puede aislar un aminoácido O.A. del medio después de que el crecimiento ha ocurrido.
- d) Los α -a.á. de la configuración L- exhiben una mayor rotación óptica positiva en ácido que en agua.
- e) Aunque la determinación de la rotación óptica específica de un a.á. se efectúa en base a la línea D del sodio (589 nm*), se ha estudiado la dispersión de 14 diferentes a.á. en agua, en ácido y en solución alcalina utilizando longitudes de onda entre 440 y 660 nm* (4). Con ello demostraron que los L- α -a.á. presentan curvas características de dispersión rotatoria, y que estos datos pueden ser utilizados para determinar la configuración. La mayoría de los a.á. presentan mayores valores de rotación a longitudes de onda cortas, ello permite en la práctica, que muestras muy pequeñas y soluciones mas diluídas puedan ser utilizadas cuando ésta caracterización óptica se efectúe a longitudes de onda mas pequeñas que la acostumbrada línea D del sodio.

3.2 PROPIEDADES QUIMICAS:

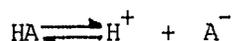
3.2.1 PROPIEDADES ACIDO BASE:

La separación, identificación y valoración cuantitativa de los a.á. son etapas necesarias para determinar su composición y secuencia en una proteína. Todo esto se basa en su conducta ácido-base. Dos propiedades físicas de los a.á. han permitido concluir que éstos se encuentran y cristalizan a partir de las disoluciones acuosas neutras, en forma de iones dipolares (o iones híbridos) en lugar de hacerlo en forma de moléculas no disociadas: sus puntos de fusión y su solubilidad en agua. Además la presencia de elevadas constantes dieléctrica y momentos dipolares que reflejan la aparición de cargas positivas

(NH₃⁺) y negativas (COO⁻) en la misma molécula, confirman lo anterior. Si los a.á. cristalizaran en una forma no iónica, quedarían estabilizados por fuerzas de Van der Waals, mucho más débiles que las fuerzas electrostáticas de atracción entre grupos de cargas opuestas, y tendrían puntos de fusión bajos (3).

Los a.á. tienen naturaleza **anfotérica**, contienen ambos grupos ácido y básico. En condiciones fisiológicas (pH= 7.4) se encuentran en forma de iones dipolares llamados **zwitter ions** (9).

Según sea su estado de ionización, los grupos carboxílico y amino se considerarán como bases débiles o ácidos débiles, y en disociación se representan por la ecuación:



en la cual HA representa al dador de protones o ácido conjugado (-COOH o -NH₃⁺) y A⁻ al aceptor de protones o base conjugada (-COO⁻ ó -NH₂). El grado de ionización depende de su constante de equilibrio o constante de disociación:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

despejando se obtiene:

$$H^+ = \frac{K [HA]}{[A^-]}$$

De acuerdo a la ecuación del Henderson-Hasselbach tenemos:

$$pH = pK + \log \frac{A^-}{HA}$$

Como el log de 1 = 0, el pK de un ácido es el valor de pH para el cual el ácido está disociado en 50%.

Al titular un ácido con una base fuerte, se disocian cantidades crecientes del primero. Las curvas de titulación se obtienen a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach, dichas curvas presentan una zona donde el pH del sistema no varía cuando se añaden pequeñas cantidades de iones H⁺ u OH⁻. El par ácido-base conjugado actúa como amortiguador en esa región de pH y su capacidad

es máxima cuando la concentración del donador de protones es igual a la concentración del aceptor, es decir cuando $\text{pH} = \text{pK}$ (9).

El comportamiento ácido-base de los anfólitos se formula en términos de la teoría de Brönsted-Lowry. Un α -a.á. sencillo monoamino y monocarboxilo, puede ceder dos protones durante su valoración completa con una base. Tomando como ejemplo a la Ala, su valoración con NaOH puede representarse mediante ecuaciones químicas (Véase Fig. 5) que indiquen la naturaleza de cada una de las especies que intervienen expresadas en forma iónica (3).

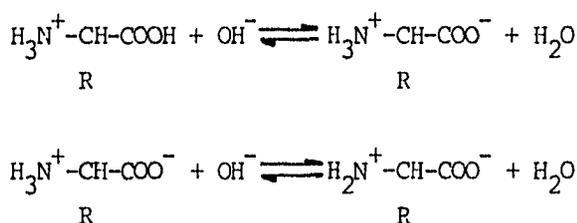


Fig. 5. Reacciones de una valoración de a.á. con NaOH, en las cuales se observa la ionización de éstos en medio básico.

La gráfica de valoración correspondiente (Véase Fig. 6), es bifásica. Los valores de pK de las dos etapas de disociación se hayan suficientemente separados para mostrar dos ramas. Cada una posee un punto medio donde el cambio de pH es mínimo al añadir OH^- . Los valores de pK para ambas etapas de disociación se obtienen extrapolando de los puntos medios de cada etapa. Cuando se llega al punto de equilibrio de ambas etapas ($\text{pH} = 2.34$ y 9.69 respectivamente) están presentes concentraciones equimolares tanto del donador como del aceptor de protones (9).

Cuando el $\text{pH} = 6.2$, la molécula no tiene carga eléctrica neta, por lo tanto, no se desplazará en un campo eléctrico. El valor de pH para el cual el compuesto está en forma de zwitter ion, se conoce como punto isoeléctrico (pI), el cual es la media aritmética del pK_1 y pK_2 (Véanse los valores correspondientes en la Tabla No. 2), para un a.á. monoamino, monocarboxílico; la fórmula mediante la cual se realiza el cálculo respectivo es la siguiente:

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_1 + \text{pK}_2}{2}$$

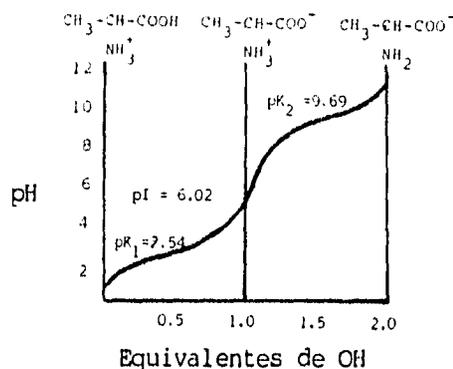


Fig. 6. Curva de Valoración de la Ala.

El comportamiento de una solución de un a.á. cuando se coloca en un campo eléctrico, dependerá de su acidez o alcalinidad. En solución muy alcalina, se observa una migración neta del a.á. hacia el ánodo. En soluciones ácidas, en cambio, la migración neta del a.á. es hacia el cátodo.

En general un a.á. tiene la solubilidad más baja cuando su solución se encuentra en el punto isoeléctrico puesto que ahí se tiene la concentración más alta del ión dipolar; a medida que la solución se hace mas alcalina o más ácida, aumentan los iones solubles (3,8).

A partir de los valores mostrados en la Tabla No. 2 puede generalizarse que: (3)

- a) El grupo α -carboxilo de los ácidos monoamino-monocarboxílicos es un ácido más fuerte que el grupo carboxilo de los ácidos alifáticos comparables. El incremento de la fuerza ácida está originado por la presencia del grupo alfa amino, que atrae electrones, y por su carga positiva que produce el efecto de campo intenso, incrementando de este modo la tendencia del hidrógeno carboxílico a disociarse.
- b) El grupo α -amino de los aminoácidos es un ácido más fuerte, (o una base más débil) que el grupo amino de las aminas alifáticas comparables.
- c) Todos los a.á. monoamino-monocarboxílicos con grupos R sin carga tienen valores casi idénticos de pK_1 y pK_2 .
- d) Muestran capacidad amortiguadora significativa en las zonas próximas a sus valores de pK ; la His es el único a.á. que presenta tamponamiento significativo en la zona de pH fisiológico.

e) El grupo beta-carboxilo del Asp, y el gamma-carboxilo del Glu, tienen valores de pK similares a los de los ácidos carboxílicos alifáticos comparables, pero considerablemente más elevados que los de los grupos alfa-carboxilos.

f) El grupo tiol (-SH) de la Cys y el grupo p-hidroxi, de la Tyr son ácidos muy débiles.

g) El grupo épsilon-amino de la Lys y el grupo guanidinio de la Arg son fuertemente básicos; sólo pierden sus protones a valores de pH muy elevados.

Tabla No. 2.
VALORES DE pK's PARA LA DISOCIACION DE
AMINOACIDOS PROTEINICOS @ 25°C (1)

Aminoácido	pK1 α -COOH	pK2 α -NH ₃ ⁺	pK3 Gpo. R
Glicina	2.35	9.78	
Alanina	2.35	9.87	
Valina	2.29	9.74	
Leucina	2.33	9.74	
Isoleucina	2.32	9.76	
Serina	2.19	9.21	
Prolina	2.95	10.65	
Treonina	2.09	9.10	
Fenilalanina	2.16	9.18	
Glutamina	2.17	9.13	
Triptofano	2.43	9.44	
Acido Aspártico	1.99	9.90	3.90
Acido Glutámico	2.10	9.47	4.07
Treonina	2.09	9.10	
Histidina	1.80	9.33	
Metionina	2.13	9.28	
Cisteína	1.92	10.78	8.33
Asparagina	2.10	8.84	
Tirosina	2.20	9.11	10.13
Lisina	2.16	9.18	10.79
Arginina	1.82	8.99	12.48

Las curvas de valoración de los aminoácidos con los grupos R que ionizan (His, Lys y Glu), son más complejas, puesto que son una combinación de curva correspondiente a la disociación del grupo R y las curvas de valoración de los grupos α -amino y α -carboxilo (3,9).

3.2.2 PRINCIPALES REACCIONES QUÍMICAS

Las reacciones características de los a.á. de acuerdo a sus propiedades como productos orgánicos, son determinadas por los grupos funcionales -amino, carboxilo, y los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales (8). Ya que todas estas reacciones pueden encontrarse en los textos de química orgánica y bioquímica, aquí mencionaremos únicamente las reacciones químicas de importancia biológica considerable (Véase Tabla No. 3) y a partir de las cuales es posible identificar y analizar a.á. libres y en hidrolizados de de proteína; identificar la secuencia aminoácida de las moléculas proteínicas; identificar los restos a.á. específicos de las proteínas nativas, que precisan para su función biológica.

Tabla No. 3

PRINCIPALES REACCIONES QUIMICAS DE LOS AMINOACIDOS

REACCIONES DEL GRUPO CARBOXILO		
NOMBRE	MECANISMO DE REACCION	APLICACION
<p>• Esterificación con etanol o alcohol bencílico .</p>	$\text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} + \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{OH} \xrightarrow{\text{H}^+} \text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2-\text{CH}_3 + \text{H}_2\text{O}$	<p>Protección del grupo - carboxilo en la síntesis de péptidos</p>
<p>• Reducción en medio anhidro con borohidruro de Li Y Al.</p>	$\text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} + \text{LiAlH}_4 \longrightarrow \text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{OH} \quad (\text{también se reducen como ésteres})$	<p>Estudio de las secuencias aminoácidas</p>
<p>• Descarboxilación con formación de aminas tóxicas : ptomaínas</p>	$\text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \xrightarrow[\text{descarboxilasa bacteriana}]{\text{CO}_2} \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	<p>Generan: cadaverina a partir de Lys, agmatina (de Arg), tiramina (Tyr), putrecina (de Orn) e histamina (de His)</p>
REACCIONES DEL GRUPO α - AMINO		
NOMBRE	MECANISMO DE REACCION	APLICACION
<p>• Acilación con haluros o anhídridos de ácido. Reactivo de elección: clorocarbonato de bencilo</p>	$\text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} + \text{Cl}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \xrightarrow{\text{HCl}} \text{R}-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{NH}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ <p style="text-align: center;">clorocarbonato de bencilo derivado benciloxicarbonílico</p>	<p>Protección del grupo - amino en la síntesis de péptidos</p>
<p>• Reacción con ninhidrina</p>	<p>Referirse a la figura 7 del presente trabajo</p>	<p>Valoración cualitativa y cuantitativa de a.á.</p>

PRINCIPALES REACCIONES QUÍMICAS DE LOS AMINOCIDOS

NOMBRE	MECANISMO DE REACCION	APLICACION
Formación de bases de Schiff en presencia de aldehídos	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{R}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{O} \end{array} \xrightleftharpoons[\text{-H}_2\text{O}]{\text{H}_2\text{C}} \begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{N}=\text{CH}-\text{R} \\ \\ \text{COOH} \\ \text{base de Schiff} \end{array}$	Intermediarios de ciertas reacciones enzimáticas donde actúan mutuamente con gpos. amino o carboxilo del sustrato
Obtención de derivados carbamílicos en presencia de gpos cianato	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} + \text{CNO}^- \xrightarrow{\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \quad \text{O} \\ \text{aminoácido carbamylado} \end{array}$	modifica las props. de la hemoglobina falciforme

26

REACCIONES DE LOS GRUPOS R

NOMBRE	MECANISMO DE REACCION	APLICACION
Oxidación del gpo. tiol de la Cys por el O atmosférico en presencia de sales de hierro u otros oxidantes suaves	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{COOH} \end{array} + \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \xrightarrow{2\text{H}} \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{NCH} \quad \quad \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{HOOC} \quad \quad \text{COOH} \\ \text{L-cistina} \end{array}$	procesos de catálisis enzimática
Formación de mercáptidos en presencia de metales pesados (Hg+2 Y Ag+2)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{COOH} \end{array} + \text{Ag}^+ \xrightarrow{\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{Ag} \\ \\ \text{COOH} \\ \text{mercáptido argéntico de la Cys} \end{array}$	

NOTA: Los grupos tiol de restos específicos de Cys, juegan un papel importante como catalizadores de ciertas enzimas, de aquí que la modificación de aquellos mediante reacciones como las anteriores, inactivan frecuentemente a la enzima.

Capítulo IV

Métodos cromatográficos y electroforéticos para el análisis de aminoácidos

IV. METODOS CROMATOGRAFICOS Y ELECTROFORETICOS PARA EL ANALISIS DE AMINOACIDOS

Gracias a la universalidad de los métodos cromatográficos y electroforéticos, la separación, identificación y análisis cuantitativo de aminoácidos resulta una tarea sencilla, reproducible y altamente sensible.

4.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Al igual que la de papel, la Cromatografía en Capa Fina (C.C.F.) es una técnica de separación desarrollada como método analítico por Egon Stahl en los años 50's (10). Se fundamenta en el reparto de un soluto entre una fase estacionaria y una fase móvil de forma que se establecen una serie de equilibrios en los que cada componente de la muestra se transfiere a la fase en la que es más soluble (9).

En esta técnica la fase estacionaria es una capa de agua unida a un soporte sólido constituido de un material adsorbente (siendo el gel de sílice o la alúmina los más comunes) y que se encuentra extendido fina y uniformemente sobre una placa de vidrio o poliéster. Se comienza aplicando la muestra en un punto cercano a la parte inferior de la fase estacionaria (cromatoplaque). La placa se coloca a continuación en una cámara que contiene la fase móvil, de forma que la aplicación puntual de los aminoácidos queda situada arriba del nivel del disolvente en el que se va a desarrollar la cromatografía.

A medida que el disolvente se mueva a través de la placa por capilaridad y entra en contacto con la cromatoplaque, los aminoácidos empiezan a repartirse entre las dos fases. Los más solubles en agua tienden a permanecer en la fase acuosa estacionaria ascendiendo más lentamente por la placa mientras que los más hidrofóbicos se disuelven en la fase orgánica ascendiendo con mayor rapidez (9).

Dado que los a.á. poseen grupos con carga, se solvatan fácilmente y por tanto, son solubles en solventes orgánicos como el agua y etanol e insolubles en solventes orgánicos de forma que los adsorbentes empleados para su separación son generalmente de baja polaridad como la celulosa, celulosa con

intercambiadores de iones, y sílicas modificadas.

En la Tabla No. 4 se presentan los adsorbentes de elección para el análisis de a.á. por cromatografía en capa fina.

Tabla No. 4.

Adsorbentes de elección para el análisis de a.á. por C.C.F..

<u>ADSORBENTE</u>	<u>MECANISMO DE SEPARACION</u>
Celulosa	Cromatografía de partición de sustancias polares.
Celulosa de intercambio iónico. (Diethyl amino - etil (DEAE) celulosa. $R-O-C_2H_4-N-(C_2H_5)_2$	Intercambio iónico favorecido por la unión del grupo DEAE a la celulosa vía un grupo éter que origina una fuerza básica comparable a la de las resinas de intercambio.
Sílica modificada (fase-reversa) e impregnada con un selector quirral y iones Cu (II).	Separación enantiomérica basada en intercambio de ligandos. Ej.: Separación de a.á. quirales.
Mezcla de sílica y una resina de intercambio aniónico o catiónico.	Intercambio catiónico y aniónico.
Sílica modificada C18.	Cromatografía en fase reversa. Fase estacionaria lipofílica que permite separar compuestos muy polares. Fase estacionaria= Sílica + Alquilsilanos C18 en diferente porcentaje.

La fase móvil conocida también como eluyente está constituida por sistemas de solventes orgánicos cuando se trata de una separación cromatográfica normal, o de disolventes polares (agua, alcoholes y ácidos o bases) cuando se lleva a cabo una separación cromatográfica en fase invertida (5). Cuando dicho solvente ha recorrido $3/4$ de la altura total de la cromatoplaca, se ha efectuado la separación de los a.á. presentes en la muestra problema entonces el solvente es evaporado de la cromatoplaca por exposición breve de la misma al calor. Las manchas invisibles son posteriormente reveladas con diferentes reactivos que las hacen visibles y permiten la identificación de los aminoácidos.

EVALUACION DEL CROMATOGRAMA OBTENIDO.

Dependiendo del propósito para el cual se realizó el análisis de aminoácidos, la evaluación del cromatograma puede ser de tipo cualitativo o cuantitativo. En el primer caso la determinación se efectúa directamente en la cromatoplaca mediante el cálculo del valor R_f característico de cada aminoácido. La obtención de valores reproducibles de R_f se logra controlando estrictamente diversos parámetros como: saturación de la cámara, composición constante de la mezcla de solventes y temperatura constante. Por ello aunque es posible identificar tentativamente un aminoácido por su R_f , es recomendable correr simultáneamente la cromatografía estándar de aminoácidos conocidos con la muestra problema. En este caso la movilidad se expresa en relación con la del estándar (5).

Dado que los a.á. no absorben la luz visible (son incoloros), y con excepción de los aromáticos (Tyr, Phe y Trp, no absorben la luz UV de una longitud de onda mayor a 240nm, queda exenta la posibilidad de visualizarlos empleando placas con indicadores fluorescentes. Sin embargo existe un método complementario al cálculo de R_f ., por el cual es posible la identificación cualitativa de los a.á. separados previamente y que consiste en el desarrollo de reacciones químicas específicas que forman compuestos coloreados o fluorescentes (Fig 7). Tal es el caso de la ninhidrina que al reaccionar con los alfa-a.á. y mediante la aplicación de calor (110°C , 5 min.) da origen a compuestos con diferentes coloraciones para cada a.á. que van desde el azul hasta el violeta o morado. Esta reacción de deaminación-descarboxilación se

muestra en la Fig. 7 (12).

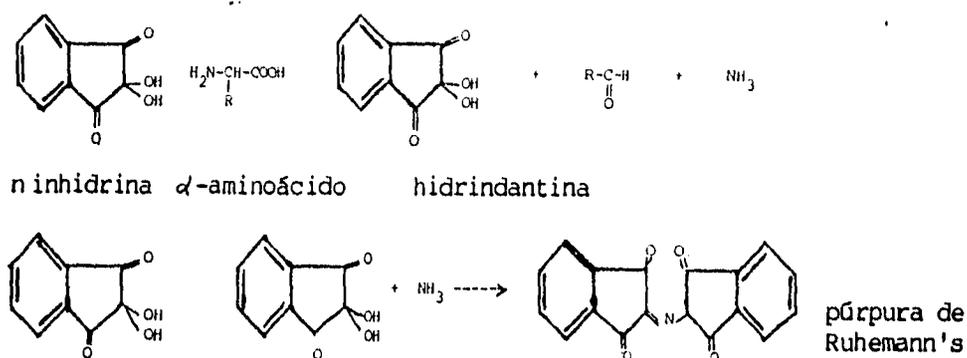


Fig. 7. Reacción de la Ninhidrina en presencia de α - a.á..

Es importante mencionar que la liberación de CO_2 no se produce en compuestos diferentes a los alfa-aminoácidos. Por ello la prolina e hidroxiprolina (iminoácidos) reaccionan produciendo un compuesto amarillo sin desprendimiento de CO_2 .

Además de la ninhidrina (reactivo de elección) existen otros reactivos alternativos que se emplean con el mismo fin (11):

- 1.- Ninhidrina/acetato de Cadmio.
- 2.- Reactivo de vainillina.

La evaluación del cromatograma puede ser también de tipo cuantitativo. Comúnmente la cromatografía en capa fina se considera en esencia como un método analítico semi-cuantitativo lo cual es verdadero si la mancha obtenida se evalúa a simple vista. En cambio, si se utiliza un "registrador fotométrico de capa fina", el término semi-cuantitativo resulta inadecuado. Las características de los registradores son: evaluación en absorción y fluorescencia, medición de longitud de onda múltiple (200 a 700nm), registro del espectro y evaluación de cromatogramas circulares (11).

Es importante mencionar que el grado de sensibilidad en la detección y cuantificación de aminoácidos por esta técnica depende en gran parte del tratamiento pre- y post-cromatográfico de la muestra.

4.1.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCION (HPTLC).

La cromatografía en capa fina de alta resolución (13) constituye un avance en cuanto a técnicas de separación por cromatografía en placa fina. Sus principales características son dos:

1.- El tamaño de partícula del adsorbente (sílica modificada) se reduce: siendo comúnmente de 5 a 17 μm , en HPTLC es de 2 a 10 μm . lo que permite disminuir considerablemente la altura de los platos teóricos aumentando con ello la eficiencia y resolución de la separación.

2.- Al encontrarse perfectamente fraccionado el adsorbente, su distribución es mas uniforme lo que disminuye el tiempo de desarrollo de la cromatografía y acorta la distancia de migración de la muestra. Con pocos centímetros recorridos se alcanza una separación óptima.

De las características anteriores se derivan las ventajas de separar aminoácidos por HPTLC empleando lo que se conoce comercialmente como "nano-placas" de fase reversa C18 50% silanizadas que las hace parcialmente hidrofóbicas dependiendo del eluyente que se utilice para la separación. Se requiere aplicar una mínima cantidad de muestra (0.01 a 0.1 μl . equivalentes a 10 y 100nl. respectivamente.), es posible aplicar un gran número de muestras en un área superficial pequeña, la difusión de las manchas es menor a 1mm. de diámetro y finalmente, se incrementa la sensibilidad de detección hasta picogramos (13).

4.1.2 SEPARACION ENANTIOMERICA DE AMINOACIDOS POR C.C.F.

El análisis enantiomérico de a.á. es importante a nivel biológico ya que la presencia de los D-a.á. en diversos tejidos, o aún en proteínas, péptidos y hormonas aisladas, interfiere en el análisis de estos últimos.

Tales enantiómeros pueden separarse de la mezcla racémica mediante cromatografía en capa fina; las cromatoplasmas que se emplean con este fin se desarrollaron entre 1984 y 1985 y actualmente se les conoce con el nombre

comercial de placas quirales (Chiralplates. Macherey-Nagel, Düren. F.R.G.) (14).

Las ventajas de esta técnica analítica radican en obtener separaciones simples, rápidas, altamente sensibles y con un efectivo control de la pureza óptica (indispensable en la síntesis asimétrica).

El mecanismo de separación de los isómeros ópticamente activos (L- y D-a.á.) se fundamenta en el intercambio de ligandos postulado inicialmente en 1952 por Dalgliesh.⁵

El selector quiral que forma parte de la fase estacionaria y el seleccionado quiral, que es el enantiómero a separar, forman complejos quelantes de mezclas diastereoméricas con el ion metálico de transición (Cu^{+2} en el caso del quiralplate). Estos complejos presentan distinto grado de estabilidad respecto a las formas D- y L- de cada a.á. lo cual permite la separación cromatográfica (14).

La fase estacionaria, placa quiral o capa enantioselectiva está formada por una placa de vidrio cubierta con sílica-gel hidrofóbica (RP18) que se sumerge en una solución al 0.25 % de acetato de Cu II. Una vez seca, la placa se deposita en una solución metanólica al 0.8% del selector quiral durante 1'. Después de secar al aire, la cromatoplaaca está lista para la separación enantiomérica.

Tomando como referencia el trabajo de Davankov et. al. los cuales modificaron las columnas normales de HPLC con alquil-derivados de L-aminoácidos (n-decil-L-histidina o n-hexadecil-L-prolina), el compuesto final elegido como selector quiral es: (2S,4R,2'RS)-N-(2'-hidroxidodecil)-4-hidroxirolina, el cual se presenta en la Fig. 8.

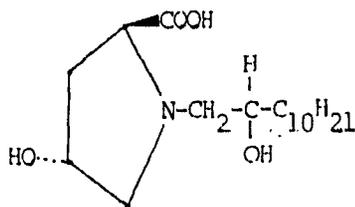


Fig. 8. Selector quiral (2S,4R,2'RS)-N-(2'-hidroxidodecil)-4-hidroxirolina.

Por otra parte, los eluentes que se emplean como fase móvil son mezclas ternarias de un alcohol miscible en agua, agua y acetonitrilo; para a.á. específicos se tienen diferentes sistemas de eluentes, por ejemplo: metanol-agua (10:80 v/v) en el caso de leucina, y acetona-metanol-agua (10:2:2 v/v/v) cuando se trata de alanina y serina (14).

4.1.3 DETECCION Y DETERMINACION CUANTITATIVA

El método seleccionado para detectar a.á. proteínicos y no proteínicos es la reacción con ninhidrina que además en la evaluación cuantitativa presenta la ventaja de aumentar la especificidad y sensibilidad en la cuantificación de los enantiómeros separados para los cuales es esencial evaluar los límites de detección debido a que la determinación de trazas de un L-a.á. en exceso de otro debe ser exacta.

El equipo usado para la cuantificación puede ser un registrador para cromatografía en capa fina de doble haz o un densitómetro donde las mediciones realizadas deberán compararse con soluciones estándares conocidas. El área de los picos respecto a su altura, graficadas contra la cantidad de muestra por mancha, proporciona las curvas de calibración. El método permite la determinación de trazas de un enantiómero en un exceso de otro por debajo del 0.1% .

El uso de una fase estacionaria quiral no es la única técnica que permite la separación enantiomérica de a.á. por CCF. Años antes del descubrimiento del chiralplate , tales separaciones fueron factibles a través de la CCF en fase reversa con muestras derivatizadas de a.á. así como empleando gradientes de temperatura y de elución (15).

La técnica se conoce como CCF-fase reversa en dos dimensiones. En la primera dimensión, los Dns-aminoácidos son separados de la mezcla original en un modo no quiral. Con el fin de asegurar una separación satisfactoria, se desarrolla un gradiente de elución con amortiguador acuoso de acetato de sodio y acetonitrilo; este último se hace variar en su concentración de 38 a 47% . Para la segunda dimensión las placas obtenidas se tratan con un complejo

cúprico de N,N-di-n-propil-L-alanina (DPA) y se desarrollan inmediatamente en una solución amortiguadora de acetato de sodio y acetonitrilo. Para optimizar la separación de cada Dns-aminoácido en sus enantiómeros se aplica un gradiente de temperatura de $6.25^{\circ}\text{C}/\text{cm}$. Con este gradiente, la cantidad de fase móvil evaporada en la parte caliente de la placa es suficiente para simular una columna teórica suplementaria que permite la resolución de los Dns-aminoácidos en sus enantiómeros.

Los sistemas cromatográficos que se emplean para obtener un gradiente de elución y de temperatura se muestran en las figuras 9 y 10 (15).

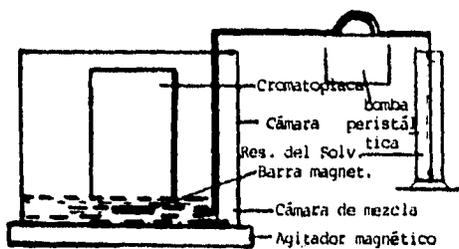


Fig. 9. Sistema cromatográfico para obtener un gradiente de elución.

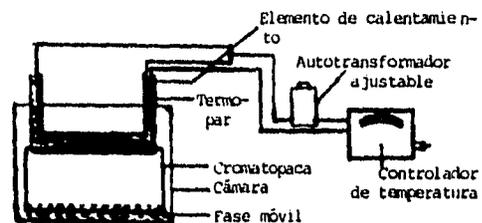


Fig. 10. Sistema cromatográfico para obtener un gradiente de temperatura.

La detección de cada derivado se lleva a cabo bajo luz UV a 366nm . con un densitómetro. La combinación de ambos gradientes permite resolver mezclas de multi-componentes.

4.2 FORMACION DE DERIVADOS DE AMINOACIDOS.

La formación de derivados se refiere a la modificación estructural de una parte de la molécula que constituye un a.á., mediante un reactivo específico, actualmente la mayoría de técnicas empleadas para el análisis de estos compuestos utilizan muestras de derivados de a.á. previamente formados que resultan más fáciles de identificar, caracterizar y/o cuantificar.

Brevemente se mencionarán los principales reactivos empleados para tales fines así como los derivados resultantes en cada caso:

a) FENILISOTIOCIANATO. REACTIVO DE EDMAN. (PITC) (9):

Produce feniltiocarbamil-derivados (PTC-aminoácidos) que se analizan por HPLC en fase reversa en función de su hidrofobicidad. La detección es espectrofotométrica por absorción de luz UV a 254nm (16, Fig 11).

b) PTC-AMINOACIDO + ACIDO TRIFLUOROACETICO (TFA) (5,9):

Produce feniltiohidantoin-derivados (PTH-aminoácidos) estables que son resultado de la degradación de Edman que a su vez permite determinar la secuencia de aminoácidos en una proteína por cromatografía.

c) REACTIVO DE SANGER. (2,4-DINITROFLUOROBENCENO: FDNB) (9, 30):

Constituye una reacción de sustitución nucleofílica aromática. El derivado así obtenido es un sólido amarillo brillante fácil de aislar e identificar por CCF o mediante espectrofotometría.

d) CLORURO DE DANSILO: CLORURO DE 5-SULFONIL,1-DIMETILAMINO-NAFTALENO.

Los n-dansyl-aminoácidos son derivados considerablemente estables y altamente fluorescentes que se identifican a través de detectores de fluorescencia en concentraciones tan pequeñas como de 1.0nm. Gracias a la mínima cantidad de muestra requerida y a que las reacciones secundarias generan poca interferencia en comparación con los problemas que se tienen al usar el reactivo de Sanger, el cloruro de dansilo se prefiere para identificar aminoácidos terminales (Fig. 11),(30).

e) ACIDO 4,4,6-TRINITROBENCENO-SULFONICO (TNBS) :

El aminoácido derivado puede medirse fácilmente por análisis espectrofotométrico a 360 nm. Es importante destacar que la prolina no reacciona con el TNBS.

REACTIVO:	MECANISMO DE REACCION:
Fenilisotiocianato . (Reactivo de Edman ; PITC)	<p style="text-align: center;"> <chem>c1ccc(cc1)N=C=S</chem> + <chem>NC(R)C(=O)[O-]</chem> $\xrightarrow{\text{pH}=9.0}$ <chem>c1ccc(cc1)NC(=S)NC(R)C(=O)[O-]</chem> PITC aminoácido PTC-aminoácidos </p>
Acido trifluoroacético (TFA)	<p style="text-align: center;"> <chem>c1ccc(cc1)NC(=S)NC(R)C(=O)[O-]</chem> + <chem>F3CCOOH</chem> $\xrightarrow{\quad}$ <chem>c1ccc(cc1)NC2C(R)C(=O)NS2</chem> $\xrightarrow[-H_2O]{+H}$ <chem>c1ccc(cc1)NC(=O)NC(R)C(=O)O</chem> PTC-aminoácido TFA derivado de tiazolinona </p> <p style="text-align: center;"> Feniltiohidantoin-derivado (PTH-aminoácido) </p>
2,4 dinitrofluoroben- ceno ; DNFB . (Reac- tivo de Sanger .)	<p style="text-align: center;"> <chem>O=[N+]([O-])c1ccc(F)cc1</chem> + <chem>NC(R)C(=O)O</chem> $\xrightarrow[-HF]{\quad}$ <chem>O=[N+]([O-])c1ccc(NC(R)C(=O)O)cc1</chem> + HF 2,4 dinitrofluorobenceno aminoácido DNF-aminoácidos </p>
Cloruro de dansilo ; (DNS-Cl)	<p style="text-align: center;"> <chem>CC1(C)N(C)C2=CC=C(C=C2)S(=O)(=O)N1C(=O)Cl</chem> + <chem>NC(R)C(=O)[O-]</chem> $\xrightarrow{\quad}$ <chem>CC1(C)N(C)C2=CC=C(C=C2)S(=O)(=O)N1C(=O)NC(R)C(=O)[O-]</chem> + HCl aminoácido DNS-Cl N-dansyl-aminoácidos </p>
Acido picrilsulfónico (TNBS)	<p style="text-align: center;"> <chem>O=[N+]([O-])c1cc(O)cc([N+](=O)[O-])c1S(=O)(=O)O</chem> + <chem>NC(R)C(=O)[NH3+]</chem> $\xrightarrow{\text{pH}=8-9}$ <chem>O=[N+]([O-])c1cc(NC(R)C(=O)[O-])cc([N+](=O)[O-])c1S(=O)(=O)O</chem> + H₂O aminoácido TNBS TNBS-derivado </p>

Fig. 11. Reacciones de formación de derivados de a.á..

4.3 CROMATOGRAFIA EN PAPEL.

A pesar de ser sustituida en la actualidad por técnicas más especializadas, la cromatografía en papel es aplicable en la separación cualitativa de aminoácidos (11). Es la técnica cromatográfica más antigua; desarrollada en 1952 por Martin, A.J. y Synge, R.L. se fundamenta en el hecho que un soluto se reparte o distribuye entre dos fases inmiscibles. Estando en un ambiente que contiene vapor de agua, el papel de cromatografía absorbe una cantidad de agua que se mantiene entre las fibras de celulosa del papel. Dicha agua se considera como uno de los disolventes que constituye la fase estacionaria. Cuando un disolvente orgánico, que es la fase móvil, se traslada por el papel impulsado por capilaridad y alcanza cualquiera de las moléculas de soluto presentes en aquel, éstas se distribuirán entre las dos fases en una proporción característica de sus coeficientes de reparto.

Para una separación cromatográfica en fase normal, mientras más soluble sea un soluto en la fase móvil, avanzará más a través del papel. Lo anterior refleja la mayor solubilidad relativa de las moléculas polares en la fase estacionaria y de las moléculas no polares en solventes orgánicos. Hay que hacer notar que para una serie no polar, a mayor longitud de la cadena lateral no polar se incrementa su carácter apolar y con ello, su movilidad (5).

Por el contrario, la cromatografía de papel en fase reversa, implica que la fase estacionaria sea de tipo hidrofóbico lo cual se logra impregnando el papel con solventes lipófilos como formamida, dimetilformamida, aceite de parafina, etc. Como fase móvil se emplean solventes hidrofílicos especialmente alcoholes. Esta inversión en las polaridades de las fases móvil y estacionaria se usa para separar aminoácidos no polares.

El análisis por cromatografía en papel se lleva a cabo aplicando la mezcla de aminoácidos (1 a 2 µl. de sol. al 1 ó 2%) en un punto marcado aproximadamente a 2.0cm. del extremo de una tira de papel filtro de alta calidad en peso y espesor que se suspende en un recipiente sellado que contiene el solvente cromatográfico. Dicho solvente puede desplazarse en dirección ascendente, descendente o circular y una vez que ha avanzado hasta el otro extremo, la tira se seca y los aminoácidos así separados se visualizan mediante

tratamiento con ninhidrina. (5)

Los parámetros más importantes que deben tomarse en cuenta para la cromatografía en papel son: el peso (g/m^2), espesor del papel que va desde 0.18 hasta 1.7 mm., y la distancia de migración, usualmente medida en $\text{mm}/30'$.

4.4 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

La cromatografía de intercambio iónico se emplea en el análisis de hidrolizados de proteínas y péptidos donde la identificación y cuantificación de los residuos de aminoácidos es importante.

Las mezclas de a.á. pueden separarse mediante esta técnica en base a las diferencias de comportamiento ácido-base de cada componente que presenta una carga neta distinta, a un pH dado (3,9).

El procedimiento desarrollado en los años 50's por Moore y Stein, emplea una columna corta (precolumna) y una larga rellena con una resina sintética, normalmente de poliestireno, a la que se han unido grupos cargados. Existen dos clases principales de resinas de intercambio iónico:

1.-Intercambiadores catiónicos: Contienen grupos cargados negativamente que retardan el flujo de cationes a través de la columna. Los aminoácidos se separan habitualmente mediante columnas de este tipo.

2.- De forma inversa, una resina que contenga grupos con carga positiva constituirá un **intercambiador aniónico** ya que retarda el flujo de aniones por la columna (9).

Este sistema constituye la fase estacionaria que permitirá el enlace de los aminoácidos ionizados. La resina de poliestireno se sulfona y equilibra con una disolución de NaOH para que los grupos sulfónicos ácidos se hallen totalmente cargados. Así, en la Fig. 12 se muestra la forma ionizada Na^+ de la resina sulfonada actúa como intercambiador catiónico.

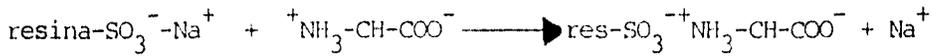


Fig. 12. Reacción de una resina sulfonada en un intercambio catiónico.

La columna de empaque con el catión intercambiador se equilibra con un buffer adecuado y una disolución ácida (pH= 3.0) de a.á. se vacía en ella. A dicho pH, los a.á. se encuentran principalmente como cationes con carga positiva neta de forma que tienden a desplazar algunos de los iones sodio ligados a la resina. Así, los a.á. más básicos como lisina, arginina e histidina, con mayor fuerza catiónica, se unen estrechamente a la columna eluyendo de ésta en mayor tiempo que los a.á. más ácidos con carga neta negativa.

La liberación selectiva de cada a.á. se realiza controlando combinaciones de pH, temperatura, y concentración del eluyente acuoso (citrato de sodio). Los a.á. descienden en la columna a velocidades y tiempos diferentes dependiendo del grado de ionización para cada valor de pH y se colectan en fracciones que se hacen reaccionar con ninhidrina y la densidad de la coloración se mide en un colorímetro de flujo. El análisis de cada fracción se registra automáticamente, y mediante un integrador que mida las áreas bajo los picos es posible cuantificar la concentración de cada a.á.. (Véase Fig. 13) (5).

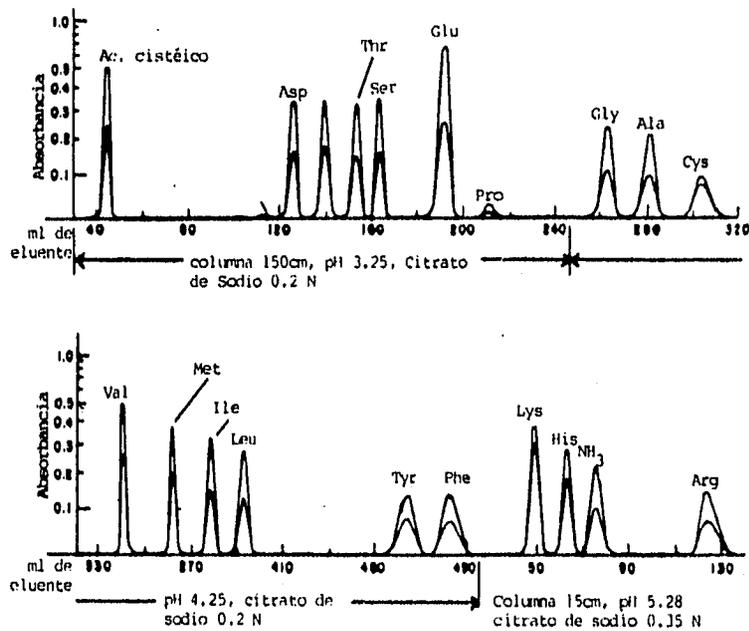


Fig. 13. Análisis automático de una mezcla de a.á. de acuerdo al método propuesto por Moore y Stein.

Actualmente la técnica descrita se ha perfeccionado de forma que se cuenta con sistemas exclusivamente diseñados para desarrollar cromatografía automatizada de intercambio iónico capaces de proveer análisis de hidrolizados y muestras fisiológicas (plasma, orina y fluido cerebroespinal) con un alto grado de resolución y en corto tiempo (16, 17).

Estos instrumentos se conocen como **analizadores de aminoácidos de alta resolución** y sus principales características son las siguientes (17):

a) Automatización:

Gracias a la cual se requiere una mínima intervención del operador ya que basta con seleccionar el método programado para iniciar el análisis.

b) Alta resolución y velocidad:

La técnica cromatográfica permite separaciones de alta resolución que se llevan a cabo en un corto tiempo con cantidades mínimas de muestra que a su vez es inyectada automáticamente y fluye a través de un loop con volúmenes nominales de 20, 50 ó 100 μ l.

c) Repetibilidad y precisión:

Se logra mediante la derivatización post-columna de los a.á., con ninhidrina en un reactor tubular de microvolumen (100 μ l) a 135°C que es la temperatura ideal para que se lleve a cabo la reacción. Dicho volumen minimiza la difusión y asegura la exactitud respecto a la cuantificación de los a.á. separados.

d) Reproducibilidad:

Se obtiene gracias a que la reacción con ninhidrina es altamente específica y estable por lo que no interfiere la presencia de sales, azúcares o grasas en la muestra.

e) Sensibilidad:

El colorímetro de doble canal detecta a.á. primarios y secundarios y tiene la capacidad de cuantificar muestras que contengan hasta 50pmol de cada componente con un CV no mayor al 2.0% y pueden identificarse componentes en cantidades tan pequeñas como 10pmol. Las longitudes de onda a las que detecta el colorímetro los componentes son 440 y 570nm.

f) Economía :

El sistema incluye reactivos estándares de calibración y soluciones amortiguadoras para análisis fisiológicos (amortiguador de litio) y de hidrolizados (amortiguador de sodio); además su consumo es mínimo (entre 10 y 20ml/hr).

Finalmente, el sistema permite hacer separaciones estándar de 30 a.á. en 50 min. proporcionando la cuantificación altamente confiable de más de 52 compuestos con reacciones positivas a la ninhidrina en poco menos de dos horas (Fig 14),(18).

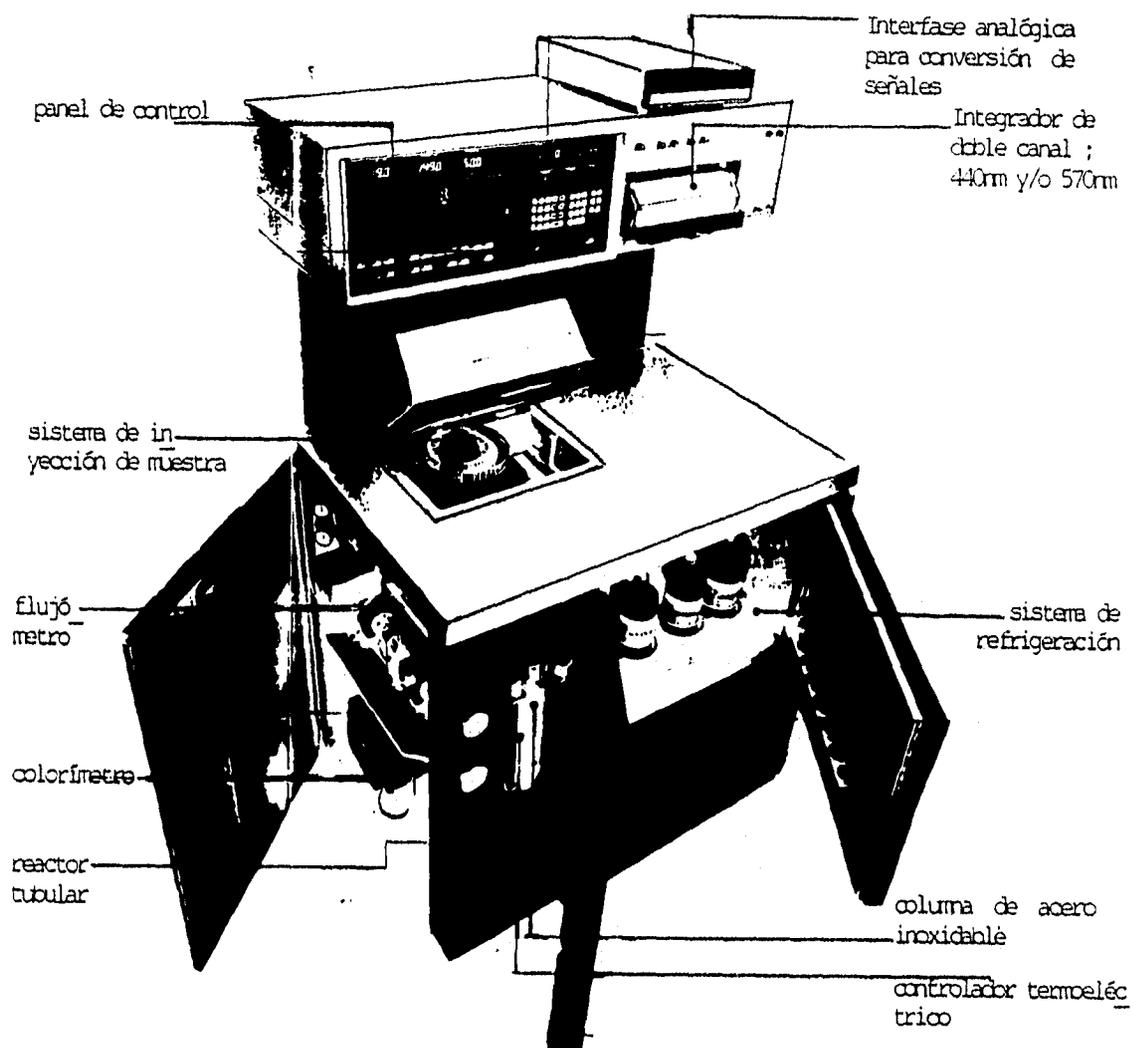


Fig. 14. Analizador de a.á. de alta resolución.

4.5 ELECTROFORESIS

Los a.á. son moléculas que en solución se encuentran en forma de iones con carga positiva o negativa (anfolitos) dependiendo del pH de su entorno. Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución de especies cargadas, cada ion se desplaza hacia el electrodo de carga opuesta lográndose con ello la separación de una mezcla de a.á. (19).

Las bases para la técnica de separación por electroforesis son: diferentes moléculas varían su grado de movilidad dependiendo de su carga promedio, tamaño, forma, así como de las propiedades del medio solvente. La técnica fue desarrollada en los años 30's por Tiselius (19) y consiste, en su forma más simple en aplicar la muestra sobre un soporte sólido que comúnmente es papel, agarosa o acetato de celulosa y que forma parte del canal de migración. Inmediatamente después de la aplicación el soporte se humedece en un buffer de pH adecuado, La elección del pH es dictada por los valores de pK de los grupos que se disocian en las moléculas de la mezcla, y se pone en contacto con depósitos de amortiguador. El papel puede cubrirse con una placa de vidrio. Posteriormente se aplica corriente de 2000 a 5000 Volts. y las moléculas con carga neta negativa al pH seleccionado, emigran hacia el ánodo mientras que aquellas con carga positiva se dirigen hacia el cátodo.

Las separaciones dependen además de la carga neta del anfolito, de su peso molecular. Si se tienen moléculas de carga idéntica, aquellas cuyo peso molecular sea más bajo, emigrarán más lejos. A pH 1.0, la lisina, histidina y arginina tienen una carga de $+2$, por lo que se dirigen al cátodo y posteriormente son separadas con facilidad en base a sus pesos moleculares (3). La separación de los componentes se visualiza secando el electroferograma y tratándolo con ninhidrina.

Con el paso del tiempo los métodos electrocromatográficos para separar moléculas cargadas se han ido perfeccionando y a pesar de que en ocasiones se ven relegados por el avance de la cromatografía de líquidos de alta resolución, no deben descartarse ya que juegan un papel importante como métodos de análisis complementarios.

Tal es el caso de la electroforesis en capa fina de celulosa que se ha optimizado mediante el diseño de un sistema refrigerante simple (placa de acero inoxidable que emplea agua como sistema de enfriamiento) que satisface a la vez los requerimientos de controlar la temperatura de la placa fina y limitar la difusión de los solutos, optimizando la separación (20). El instrumento ha sido diseñado principalmente para el análisis de a.á. pudiendo separarse 23 de ellos por cromatografía en dos dimensiones.

Mediante esta técnica es posible también cuantificar cada componente practicando un análisis colorimétrico con ninhidrina.

4.5.1 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ALTA RESOLUCION

Una variante más dentro de la electroforesis adopta el uso de capilares como canales de migración de forma que la técnica se conoce como **electroforesis de zona capilar (CZE)** o **electroforesis capilar de alta resolución (HPCE)**. Sus ventajas son considerables: análisis rápido y automatizado de múltiples muestras, exactitud en la cuantificación y óptima reproducibilidad. Se ha demostrado la existencia de hasta un millón de platos teóricos lo cual hace el método altamente eficiente, garantizando un 100% de resolución (19).

Los pioneros en el desarrollo de la electroforesis capilar son Virtanen, Mikkers, Everaerts y Verheggen (1979) (21). Un sistema común de electroforesis capilar consta de un capilar de sílica fundida con un diámetro interno de 20 hasta 200 μm . La longitud del capilar varía desde 10 hasta 100 cm. Ambas terminales del capilar se depositan en reservorios electrolíticos que contienen electrodos; se requiere además de una fuente de poder que suministre voltajes de 20 a 30 KV y de un sistema detector que puede ser de tipo óptico (absorbancia U.V. y fluorescencia), electroquímico, de conductividad o por espectroscopía de masas. Específicamente en el análisis de a.á. se emplea un detector de fluorescencia conocido como fluorescencia láser-inducida (LIF). El diagrama que ilustra el sistema descrito se puede observar en la Fig. 15 (19).

En general los instrumentos que se emplean para efectuar electroforesis capilar se caracterizan porque la inyección de la muestra se lleva a cabo, ya sea por flujo electroosmótico o hidrostático (mediante presión, vacío o gravedad); el volumen de muestra es del orden de nano y picolitros; el sistema provee un flujo muy bajo de la solución amortiguadora que además puede

intercambiarse automáticamente de acuerdo a los requerimientos del análisis; los métodos de detección son altamente sensibles y permiten identificar compuestos en volúmenes de 30 pl. o menos.

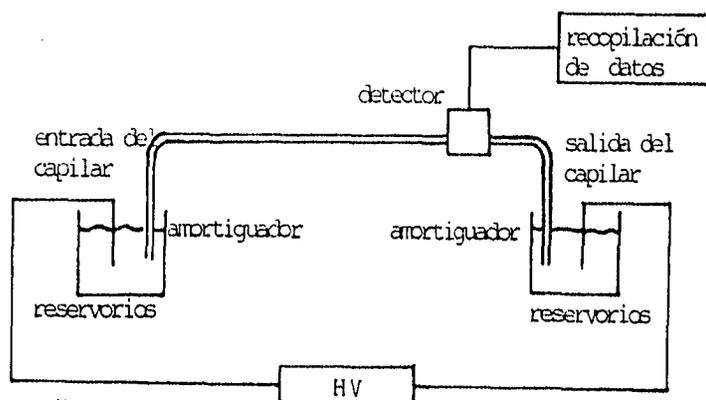


Fig. 15. Diagrama general de un sistema de electroforesis capilar.

Las muestras biológicas o hidrolizados de a.á. pueden analizarse con éxito mediante HPIC y utilizando derivatización en columna con o-ftalaldehido (OPA) el cual genera derivados estables que se detectan por fluorescencia láser-inducida (Fig 16), (19).

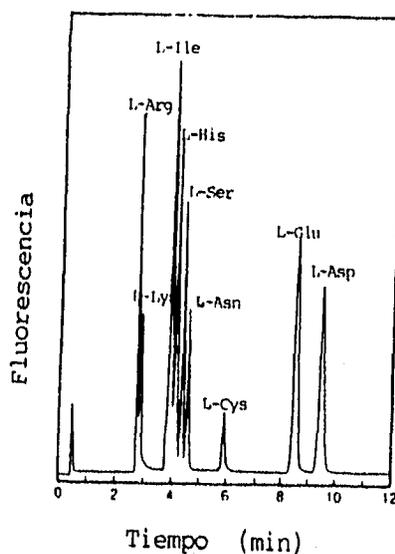


Fig. 16. Electroferograma capilar de una mezcla de 9 derivados OPA de a.á. en columna y detección subsecuente por fluorescencia láser inducida.

4.5.2 ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL Y SEPARACION ENANTIOMERICA DE A.A.

Aún cuando la electroforesis capilar en gel se utiliza de manera más extensa para separar biopolímeros (proteínas por ejemplo) en base a su tamaño, Guttman et.al. comprobaron la eficiencia del gel de poliacrilamida como soporte de agentes acomplejantes específicos conocidos como ciclodextrinas, que aumentan la selectividad en la separación por electroforesis capilar (22).

Las β -ciclodextrinas (β -CD) son oligosacáridos compuestos de siete unidades de glucosa conectadas entre si mediante enlaces β -1,4. Por su forma de cono truncado y su composición, presentan dos propiedades importantes:

- a) Pueden admitir en su interior relativamente hidrofóbico, una molécula no polar, pero su entorno lo forma un disolvente polar gracias a la presencia de grupos hidroxilo primarios y secundarios en su superficie externa.
- b) Actúan como agentes acomplejantes por lo que pueden usarse con éxito para separar moléculas quirales.

La segunda característica permite que se pueda realizar el análisis enantiomérico de Dansyl-D,L-aminoácidos para el cual se sintetizan derivados alil-carbamoylados de ciclodextrinas (ac- β -CD) que al copolimerizarse (8) con acrilamida forman geles líquidos que se transfieren a los capilares de sílica donde se efectúa la separación por electroforesis (23). Los geles líquidos así obtenidos tienen ventajas sobre los sólidos: no hay formación de burbujas, su vida media es mayor y son compuestos estables y reproducibles.

La Fig. 17 representa los electroferogramas tipo que resultan de separar 3-dansyl D,L-aminoácidos mediante la técnica descrita (23). Es importante mencionar que la selectividad quiral de los geles depende de la concentración de ciclodextrina en los mismos.

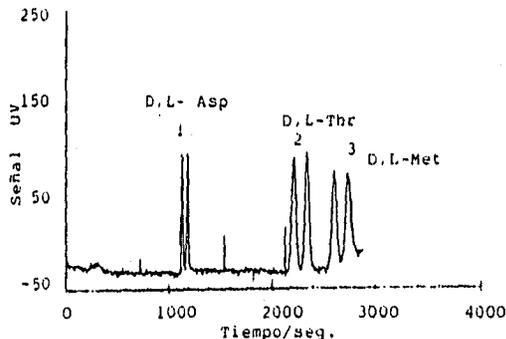


Fig. 17. Separación enantiomérica de dansyl-D,L-Thr, Asp, y Met en capilares de gel líquido.

4.6 CROMATOGRAFIA DE GASES.

La cromatografía de gases (24, 44) es una técnica analítica más que permite separar y cuantificar muestras de a.á. de interés clínico. Un requisito con el que debe cumplir toda sustancia a ser analizada por este método, implica que por si misma, o por formación de derivados, sea volátil y estable a elevadas temperaturas. Las principales características que conforman un sistema de cromatografía de gases son: (Véase también la Fig. 18)

1.- UNA FASE MOVIL:

Constituída siempre por un gas, generalmente N_2 , H_2 o He.

2.- UNA FASE ESTACIONARIA:

Puede ser sólida o líquida. De aquí que se hable de dos tipos de cromatografía: CROMATOGRAFIA DE GASES SOLIDA (GSC); en ella la fase estacionara es un polímero sólido, poroso, de alúmina, sílica o carbón que está empacado directamente en la columna. Constituye el adsorbente activo. CROMATOGRAFIA DE GASES LIQUIDA (GLC); en este caso la fase estacionaria es un líquido que a su vez se puede incluir en dos tipos de columnas: **capilares y empacadas.**

3.- COLUMNAS CROMATOGRAFICAS:

Como se dijo anteriormente, son de dos tipos: en las capilares, la fase líquida se deposita directamente en la superficie interior de la columna pudiendo estar unida químicamente a ella. A la unión se le conoce como "inmovilización de la fase estacionaria" y es deseable en muchos casos porque previene el deterioro de la columna y disminuye la probabilidad de deformación, permite remover contaminantes e impurezas por la adición de solventes a presión y tolera la inyección de grandes volúmenes de muestra. Las columnas capilares no requieren de un soporte debido a que su pared interna está cubierta con la fase estacionaria. Dicho arreglo se conoce como Wall Coated Open Tubular (WCOT).

Por otro lado, en las columnas empacadas, la fase estacionaria líquida se deposita en un soporte sólido, inerte, finamente dividido (tierra de diatomeas, polímero poroso, grafito) que después se translada a la columna.

4.- FUENTE DE PODER:

Se encarga de suministrar a presión el gas requerido para efectuar la separación: tanto el acarreador, como los gases combustibles que se emplean en el detector de ionización de flama.

5.- PUERTO DE INYECCION DE LA MUESTRA:

Los compuestos que van a separarse se inyectan dentro de la corriente de gas, ya sea en solución o en fase vapor. En base a la configuración del cromatógrafo, la muestra problema puede inyectarse directamente en la columna o vaporizarse previamente en el inyector y mezclarse con la fase móvil para entrar después a la columna.

6.- HORNO CON CONTROL DE TEMPERATURA:

Ya que se debe mantener la temperatura en el interior de la columna así como en el detector para evitar que se condense la muestra e interfiera en la aparición de la señal correcta, el controlador de temperatura es esencial.

7.- DETECTOR:

Cuando los compuestos se han separado, emergen de la columna y pasan a través de un detector diferencial que se elige de acuerdo a la naturaleza de los compuestos por analizar. El detector de elección para resolver mezclas de a.á. es el de ionización de flama, caracterizado por conferir sensibilidad y una respuesta lineal que varía en proporción directa con la cantidad de compuesto presente. El mecanismo por el cual realiza la detección consiste en ionizar la muestra y descomponerla hasta formar radicales libres que son los que generan la señal de identificación.

8.- INTEGRADOR:

De forma automatizada integra los datos provenientes del detector, calcula el área de los picos de interés y en función de ella cuantifica cada sustancia generando un cromatograma del análisis.

El proceso de separación por cromatografía de gases tiene como principio la distribución o reparto sucesivo del compuesto vaporizado, entre la fase móvil y la fase estacionaria. Este fenómeno se conoce como "distribución dinámica en contracorriente".

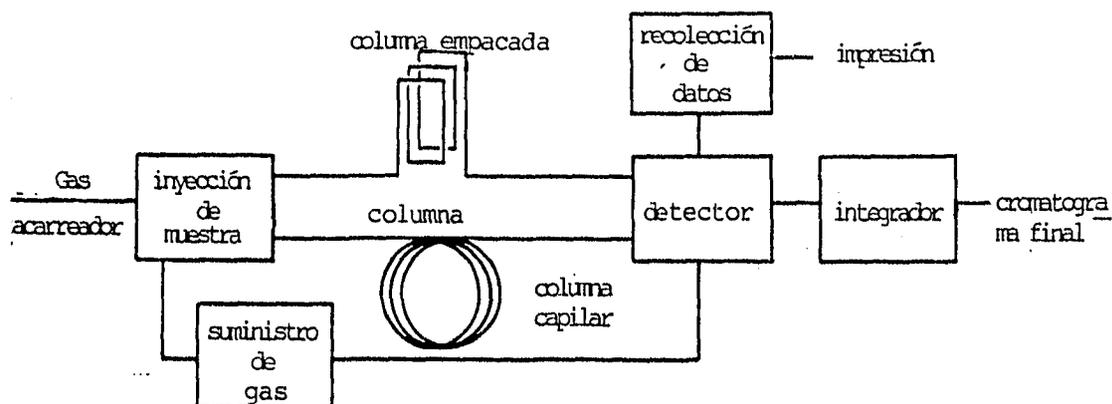


Fig. 18. Diagrama general de un sistema de cromatografía de gases.

La muestra se translada por la columna mediante el gas acarreador y tiene afinidad en mayor o menor grado por la fase estacionaria en la cual permanece cierto tiempo (adsorción) y luego regresa a la fase móvil continuando su paso por la columna. De esta forma se logra la separación que ocurre siempre y cuando los compuestos de interés tengan diferentes factores de capacidad. El factor de capacidad se define como la razón que existe entre el tiempo de retención del componente y el tiempo requerido para que éste migre a través del sistema cromatográfico sin que interaccione con la fase estacionaria (tiempo muerto, tiempo de retención del aire o del gas). Además juega un papel muy importante ya que determina la resolución, tiempos de retención y la eficiencia de las columnas. Su valor depende de la naturaleza química del componente en cuestión ; de la naturaleza, cantidad y área superficial de la fase líquida; de la temperatura de la columna y del flujo del gas. Manteniendo constantes a nivel experimental ciertas condiciones, es posible encontrar factores de capacidad característicos para cada compuesto.

El tipo de interacción entre el compuesto y la fase (selectividad), está determinado por los grupos funcionales que a su vez dictan la polaridad de la fase.

Sin embargo, la ambición por obtener mayor resolución y disminuir los tiempos de retención, lo que repercute en un tiempo menor de análisis, han llevado a estudiar y comparar varios ésteres acil-alquílicos. Como ejemplo de ello tenemos:

N(O,S) acetil derivados de diversos ésteres de a.á.; los ésteres investigados incluyen metil, etil, propil, butil, y pentil-ésteres. Los tres primeros presentan tiempos de retención similares mientras que la separación de 14 a.á. proteínicos se ve favorecida empleando n-butil e isopropil-ésteres (27).

Las observaciones anteriores reflejan la marcada influencia del grupo éster en los tiempos de retención y a la vez concuerdan con la hipótesis teórica: un grupo éster pequeño genera tiempos de retención cortos, por lo que se usa con el fin de reducir el tiempo de separación lo cual permite disminuir la temperatura del horno y aumentar la vida de la columna. Sin embargo los tiempos de retención relativos pueden variar si se altera dicho grupo éster. Además los ésteres que contienen alcoholes secundarios eluyen más rápido que los formados por alcoholes primarios.

Como se mencionó anteriormente, la fase estacionaria influye de forma directa en la separación por cromatografía de gases. Por ello, tanto los TFA-derivados como los HFB-derivados presentan diferente orden de elución entre sí al variar las fases estacionarias (26). Por ejemplo: el orden de elución de un a.á. hidroxilado respecto a su análogo no hidroxilado dependerá de la polaridad de la fase estacionaria. Tanto mayor sea la polaridad, más grande será el tiempo de retención del derivado aminoácido hidroxilado.

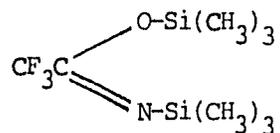
Respecto a columnas empacadas, se sabe que también el material empleado como soporte puede influir en el patrón de elución de una muestra así como en la separación de los distintos aminoácidos entre sí (25).

AGENTES SILANTES O DE SILACION.

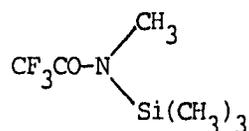
El término silación en cromatografía de gases se asocia con el reemplazo de un átomo de hidrógeno activo por un grupo trimetil-silil ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). Esta sustitución da origen a un TMS-derivado (26). En ocasiones se usan también grupos trialquil-silil con cadenas alquílicas largas o dimetil-silil como

agentes de derivatización. Los derivados se caracterizan por su volatilidad, tiempos de retención cortos así como por ser térmicamente estables. Los reactivos silantes de elección para aminoácidos son cuatro básicamente:

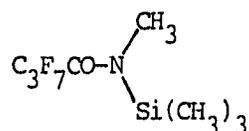
1.- BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida):



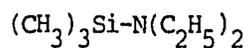
2.- MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida):



3.- MSHFBA (N-metil-N-trimetilsilil-heptafluorobutiramida)



4.- TMSDEA (N-trimetilsilil-dietilamina):



4.6.2 SEPARACION ENANTIOMERICA DE AMINOACIDOS

La resolución de mezclas enantioméricas de aminoácidos por cromatografía de gases es posible gracias al desarrollo de fases estacionarias quirales. Bayer, E. y Frank, H fueron los primeros en introducir en 1977, fases quirales de polisiloxano inmovilizadas químicamente que son térmicamente estables, poco volátiles y permiten la remoción de agentes contaminantes provenientes de muestras fisiológicas mediante la inyección de solventes a presión.

Actualmente se conoce comercialmente como L-Chirasil-Val; se obtiene por la unión o acoplamiento de la L-Valina-tert-butilamida a un copolímero formado por unidades de dimetil-siloxano y carboxialquilmetil-siloxano (28). Las ventajas principales de estas fases dependen de su baja polaridad y de su estabilidad térmica la cual reduce considerablemente el tiempo de retención del soluto.

Con la finalidad de mejorar la enantioselectividad, resolución y tiempo de análisis de mezclas de a.á., se han investigado nuevas fases quirales derivadas de las primeras (29) que hacen de la cromatografía de gases capilar una técnica muy importante en el análisis de a.á. a nivel clínico y de investigación.

4.7 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución constituye de manera definitiva la técnica cromatográfica por excelencia en el análisis, no sólo de a.á. sino de numerosos compuestos químicos (30). Sus ventajas principales radican en la resolución, gran sensibilidad (lo que permite realizar análisis de trazas (femtomol)) y en que es un método reproducible, rápido y completamente automatizado. Su mayor desventaja: Costo Elevado.

El principio por el cual se lleva a cabo la separación de los compuestos presentes en una mezcla, particularmente de a.á., puede ser: de partición, adsorción, o intercambio iónico, cada uno de los cuales ha sido tratado previamente. El que se lleve a cabo alguno de los tres pasos depende del tipo de fase estacionaria que se utilice.

Las muestras fisiológicas que se analizan por HPLC deben encontrarse en solución y con el menor número de componentes que sin ser de interés, puedan interferir en la separación. Con este fin, técnicas sencillas como la centrifugación, dilución, extracción con disolventes, resultan muy útiles (31). por otro lado la mayoría de las separaciones pueden llevarse a cabo a temperaturas mucho menores que las requeridas en cromatografía de gases y que van desde temperatura ambiente hasta 60°C aproximadamente. Ello disminuye la necesidad de preparar derivados volátiles o de arriesgar la estabilidad de los componentes al someterlos a altas temperaturas.

Básicamente, todo cromatógrafo de líquidos de alta resolución se compone de 5 partes (Fig. 20):

a) SISTEMA DE BOMBEO:

Se encarga de suministrar cantidades específicas de fase móvil desde los reservorios que la contienen, hasta la columna cromatográfica. A su vez se divide en un sistema de baja presión encargado de sustraer el solvente y medir la cantidad que dosificará, y un sistema de alta presión (5000 a 10,000 psi) que proporciona la fuerza al solvente para que sea conducido a través de la columna.

b) SISTEMA DE INYECCION:

Se encarga de inyectar la muestra a la fase móvil. Puede ser de tipo manual mediante el uso de microjeringas y un loop que suministra únicamente la cantidad de muestra requerida. El segundo sistema de inyección es automático y puede a su vez controlar el volumen de muestra, el número de inyecciones y el intervalo de tiempo entre una inyección y otra.

c) COLUMNA CROMATOGRAFICA:

Específicamente en el análisis de aminoácidos se usan fases estacionarias no polares (hidrocarbonadas) unidas a sílica microparticulada que resultan de gran potencial para efectuar separaciones rápidas y selectivas. Los empaques de este tipo, conocidos como soportes en fase reversa, se fabrican aumentando su naturaleza hidrofóbica y bloqueando cualquier interacción iónica debida a los grupos silanol que permanezcan sin reaccionar (30).

d) SISTEMA DE DETECCION:

Está constituido por una celda montada al final de la columna cromatográfica a través de la cual pasa la fase móvil con el material eluido. Conforme el flujo va saliendo de la columna, un haz de radiación cruza en dirección perpendicular a la celda produciendo cierto grado de absorción que ocasiona cambios energéticos medibles gracias a los cuales pueden caracterizarse los a.á. separados.

Como en el caso de cromatografía de gases, los detectores que se emplean pueden ser de tipo electroquímico (potenciométrico, voltamétrico, polarográfico), de índice de refracción, o espectrofotométrico (UV-visible, fluorescencia) (24) siendo éste último de primera elección.

Los detectores espectrofotométricos pueden a su vez, ser de longitud de onda fija, variable y múltiple. Los primeros operan a una longitud de onda específica, generalmente de 254nm y su sensibilidad es hasta de picomoles (9).

Los detectores de longitud variable están constituidos por lámparas de deuterio o de Xenón y de un monocromo o filtro de interferencia cuya función es generar una radiación monocromática a cierta longitud de onda seleccionada por el operador. Actualmente estos detectores son programables y pueden efectuar cambios en la longitud de onda durante el análisis.

Por su parte los detectores de longitud de onda múltiple se caracterizan por su capacidad de medir la absorbancia a 2 o más longitudes simultáneamente; los hay con arreglo de diodos, donde continuamente la radiación está pasando a través de la celda; la muestra se resuelve entonces dentro de las diferentes longitudes de onda constitutivas que se detectan individualmente por el arreglo de diodos. Este tipo de detectores obtienen datos de absorbancia a lo largo de todo el rango UV-visible proporcionando cromatogramas a múltiples longitudes de onda así como el espectro de los picos de elución.

Con respecto a los detectores fluorométricos, se sabe que éstos son sensibles a compuestos fluorescentes por naturaleza o que pueden convertirse en derivados fluorescentes ya sea mediante transformación química del compuesto original, o acoplándolo con reactivos fluorescentes que se unen a grupos funcionales específicos. La ventaja de los detectores radica en su extrema sensibilidad (femtomoles) (32).

5.- SISTEMA DE INTEGRACION:

Su función es coleccionar, analizar, imprimir y guardar los datos obtenidos en el análisis. Proporciona los cromatogramas completos con altura y áreas de los picos resultantes, identificación de la muestra y variables contenidas en el método.

Específicamente en cromatografía de fase reversa, la elución de los componentes se lleva a cabo utilizando gradientes. Un gradiente de elución en HPLC se define como el cambio en la fuerza de la fase móvil durante el curso de un análisis. Este cambio se da en forma de polaridad del solvente, fuerza iónica, pH, o múltiples y complejas interacciones entre el empaque de la columna y los componentes de la muestra (33).

Generalmente los gradientes de elución son necesarios cuando la composición isocrática (constante) de una fase móvil no es capaz de resolver adecuadamente los componentes de una mezcla en un tiempo normal de análisis. De aquí que el objetivo principal de emplear la técnica descrita es obtener una óptima resolución en el mínimo tiempo.

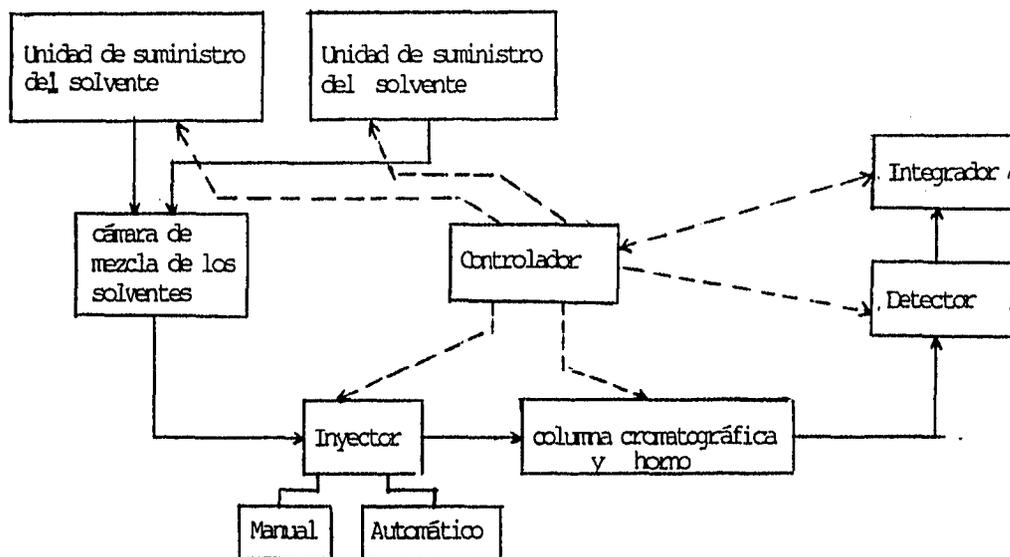


Fig. 20. Diagrama de flujo de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución

En el caso de muestras de a.á. la separación de los componentes se realiza en base a su hidrofobicidad; por ello el gradiente de elución comúnmente empleado modifica la polaridad de la fase móvil por un incremento del solvente orgánico (acetonitrilo o propanol de preferencia) (34).

Actualmente se cuenta con sistemas de HPLC constituidos por módulos de liberación de solvente (SDS) que permiten elegir entre varias combinaciones para desarrollar gradientes ternarios y cuaternarios. Las grandes ventajas de este tipo de módulos radican en la exactitud y precisión de la composición del solvente así como en asegurar resultados reproducibles aún con bajos

porcentajes de alguno de los solventes que conforman el gradiente (35).

Además del empleo de gradientes y del tipo de fase móvil que se elija, en la Tabla No. 5 se presentan otros parámetros importantes a considerar en la separación por HPLC (32).

Tabla No. 5.

Parámetros importantes a considerar en la separación por HPLC.

<u>VARIABLES:</u>	<u>1a. ELECCION:</u>
1. Columna: - dimensiones - tamaño de partícula - fase estacionaria	25 X 0.46 cm 5 µm C8 ó C18
2. Temperatura:	40°C
3. Tamaño de muestra: - volumen - masa	50 µl 100 µg.
4. Velocidad de flujo:	1-2 ml/min.

4.7.1 FORMACION DE DERIVADOS

En el diagnóstico clínico de aminoacidopatías, el análisis de muestras fisiológicas por HPLC constituye una herramienta de gran aplicación por su elevada sensibilidad, resolución y reproducibilidad cuantitativa. En dichos análisis la formación de derivados de las muestras para su detección por fluorescencia o por espectroscopía UV, ocupa un papel sobresaliente. Los principales reactivos químicos que se elijen para derivatizar aminoácidos son los siguientes (30):

1. O-FTALALDEHIDO; OPA: En presencia de un -aminoácido y de 2-mercaptoetanol, produce, a pH 9.0, un compuesto fluorescente color azul intenso, estable, que se forma temperatura ambiente y tiene ventaja sobre la ninhidrina en cuanto a sensibilidad (36).

2. CLORURO DE FLUOROENIL-METIL-OXI-CARBONILO; Fmoc: Reacciona con los a.á. secundarios permitiendo su detección por fluorescencia. Además los productos secundarios no interfieren en el análisis debido a que su elución es posterior a la de los picos de interés (34).

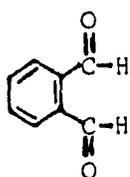
3. CLORURO DE N,N DIMETIL-AZOBENCENO-SULFONILO; DABS: Produce dabsyl-aminoácidos que se detectan a 436nm (rango del espectro visible).

4. FENILISOTOCIANATO. (REACTIVO DE EDMAN); PITC: Produce fenil-tiocarbamilderivados (PTC-aminoácidos) cuya detección se lleva a cabo por absorción UV a 254nm. La sensibilidad obtenida por este método fluctúa en el rango de 1 a 5.0pmol^l (16).

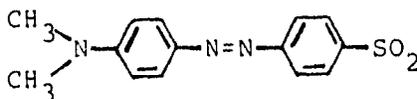
5. CLORURO DE DANSILO; DNS-Cl: El cloruro de 1-dimetilamino-naftaleno-1-sulfonilo. genera dansyl-aminoácidos fluorescentes, altamente estables, que se detectan hasta en concentraciones de 1.0nm.

Cada uno de los compuestos descritos anteriormente se presentan en la Fig.

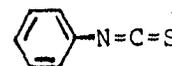
21.



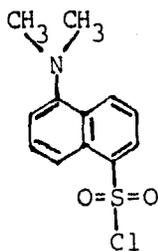
o-ftalaldehído



Cloruro de N,N dimetil-azo-benceno sulfonilo



fenilisotio_cianato



Cloruro de dansílo

Fig. 21. Reactivos utilizados para formar derivados de a.á..

El procedimiento de formación de derivados puede ser de dos tipos: **pre y post-columna**. El primero es un sistema que se desarrolló posteriormente al de post-columna; permite llevar a cabo de forma automatizada las reacciones de

formación de derivados con OPA y FMOC en una misma corrida (Fig. 22) lo que elimina los pasos de evaporación del reactivo o el catalizador y la extracción del derivado obtenido minimizando el error que manualmente resulta común.

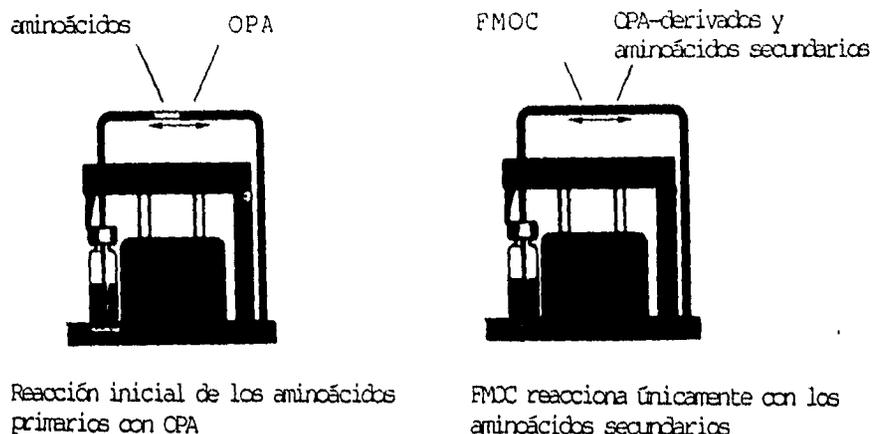


Fig. 22 Formación de derivados OPA y FMOC.

En la formación de derivados post-columna, la reacción química se produce al final de la columna cromatográfica, una vez efectuada la separación, y antes de que el compuesto pase al detector. Los equipos cromatográficos permiten realizar automáticamente este proceso. Además del empleo de reactivos fluorogénicos, la ninhidrina sigue siendo una muy buena elección.

Hasta ahora las variantes de la cromatografía de líquidos de alta resolución empleadas en el análisis de a.á. se presentan en la Tabla No. 6.

En lo referente a equipo cromatográfico, el avance ha sido extraordinario de manera que los cromatógrafos de líquidos pueden ser dedicados exclusivamente al análisis de aminoácidos (35). Sobresale su utilidad ya que el sistema de formación de derivados pre-columna seguido de cromatografía en fase reversa se traduce en análisis rápidos de alta resolución en los que el largo proceso de recalibración se reduce considerablemente.

Tabla No. 6.

Condiciones cromatográficas y de detección	Análisis	
	Sensibilidad (picomoles)	Tiempo (minutos)
AMINOACIDOS LIBRES		
Grupos - NH ₂ unidos a la columna (u.v. 200nm)	-	30
Columna fase reversa RP-18 (OPA postcolumna)	<40	30
Intercambio catiónico (OPA postcolumna)	10	45
OPA - DERIVADOS		
Columna fase reversa RP-8 (fluorescencia)	10	55
Columna fase reversa RP-18 (fluorescencia)	0.5	30
Columna fase reversa RP-18 (electroquímico)	0.5	30
DNS - DERIVADOS		
Columna fase reversa RP-8 (fluorescencia)	<40	50
Columna fase reversa RP-18 (fluorescencia)	-	40
Columna fase reversa RP-18 (u.v. 254nm)	100	30
DABS - DERIVADOS 1		
Columna fase reversa RP-18 (visible : 438nm)	5	45
FMOC - DERIVADOS 2		
Columna fase reversa RP-18 (fluorescencia)	<1.0	30
PITC - DERIVADOS		
Columna fase reversa RP-18 (u.v. 254nm)	>1.0	45

1 DABS, cloruro de dimetilazobenceno sulfónico

2 FMOC, cloruro de fluorocentmetiloxycarbonilo

4.7.2 SEPARACION ENANTIOMERICA

De igual forma es posible el análisis enantiomérico de D,L-a.á. por cromatografía en fase reversa ya sea, en presencia de OPA y un compuesto sulfhidrido quirale, o como Dns-derivados a partir de aditivos hidrofóbicos quirales y cromatografía de intercambio de ligandos para la cual el Cu(II), Zn(II) o Ni(II) son los metales acomplejantes (37).

En el primer caso, es posible separar los enantiómeros de complejos quelantes formados por la reacción del a.á. con Cu(II) y un segundo a.á. ópticamente activo en la fase móvil (38). Los segundos a.á. más comunes son L-prolina, L-histidina y L-arginina. Entre todos los ligandos quirales estudiados, solamente el éster metílico de la histidina posee selectividad aquiral para los dansyl-aminoácidos y selectividad quirale para los respectivos D y L-enantiómeros. Esta técnica se ha extendido de forma que pueden resolverse también OPA-derivados. Los aminoácidos libres se hacen reaccionar con OPA en presencia de N-acetil-L-cisteína que actúa como reactivo sulfhidrido quirale y es el responsable de la formación de una mezcla diastereomérica de complejos quelantes a partir de la cual se logran resolver los isómeros. En este caso la fase móvil se compone de L-prolina y Cu(II).

Recientemente, el uso de monohalo-s-triazinas quirales para la resolución enantiomérica de D,L-aminoácidos por HPLC, ha sido satisfactorio (39). Las

ventajas que hacen de interés a estos nuevos reactivos quirales son básicamente: Poder disminuir las grandes diferencias en los tiempos de retención de los diastereómeros formados con otros reactivos quirales como 9(+) fluorenil-etilclorofornato, tioles/OPA, variantes estructurales del reactivo de Sanger, entre otros; aprovechar la trifuncionalidad del compuesto inicial (tricloro o trifluoro-s-triazina) para diseñar diferentes reactivos con variados grupos de detección que puedan combinarse con formas quirales distintas. Todo ello con el objetivo principal de obtener reactivos adecuados para desarrollar derivatización precolumna y la separación indirecta de aminoácidos enantiómeros.

4.7.3 ANALISIS DE AMINOACIDOS AROMATICOS

Dado que las aminoacidopatías de mayor incidencia se originan por desviaciones en el metabolismo de los a.á. aromáticos, su análisis resulta de gran aplicación en el diagnóstico clínico, por lo que el desarrollo y optimización de las separaciones de moléculas biológicas complejas por HPLC se encuentra también a la vanguardia.

Se ha reportado la necesidad de contar con técnicas rápidas y sensibles capaces de monitorear la concentración de Tyr, Phe y Trp en el laboratorio clínico. Uno de estos métodos permite aislar y cuantificar los a.á. descritos en muestras plasmáticas utilizando una fase móvil isocrática (amortiguador: LiOH:Citrato de Na; pH=5.0), una columna en fase reversa (RP-18) y detección fluorescente (ex=280 nm, em=330 nm) o por derivatización post-columna con OPA (31).

Los resultados de este método permiten detectar como mínima concentración (mg/l) en plasma: 0.4 de Phe, 0.5 de Tyr y 0.1 de Trp, lo que se traduce en poder monitorear de forma rutinaria los tres a.á. en muestras tan pequeñas como de 1 ó 2 mcl. de plasma en 40 minutos con la linealidad y reproducibilidad necesaria.

4.7.4 HPLC Y ESPECTROFOTOMETRIA DE BARRIDO RAPIDO

Actualmente las técnicas se han sofisticado y emplean detectores UV con arreglo lineal de fotodiodos (40) siendo además de barrido rápido. Estos aprovechan las propiedades de absorción natural apreciable por arriba de los 220 nm que únicamente los a.á. aromáticos y la cisteína presentan.

La espectrofotometría de barrido rápido es un sistema de detección utilizado tanto en cromatografía de gases como en HPLC que ofrece la posibilidad de simultáneamente, identificar el espectro y determinar cuantitativamente las sustancias analizadas. El principio por el cual opera este sistema consiste en el barrido periódico del espectro por arriba de 100 espectros por segundo mediante un generador de deflexión conectado a un monocromador controlado electrónicamente. De esa forma se identifican instantáneamente las fracciones separadas detectando los componentes que se consideran difíciles de resolver por los métodos espectrofotométricos comunes (41).

Conjuntando la detección UV de Barrido rápido con Softwares capaces de presentar los espectros resultantes (A, λ) durante la elución (t) , en forma de gráficas isométricas tridimensionales (A, λ, t) o mejor aún como mapas bidimensionales (λ, t) de contorno (35), se logra caracterizar y resolver picos fuertemente traslapados que son resultado de la similitud entre los espectros del componente principal y su producto de biotransformación. Específicamente se ha tratado el caso de la Tyr y su metabolito la Dopa cuyos espectros al ser muy similares conducen a una elución simultánea. El poder validar la homogeneidad de un pico cromatográfico nos asegura la separación de todos los componentes presentes en una matriz biológica.

Para ello se puede desarrollar efectivamente la técnica de supresión de espectro (42) que consiste en manipular los valores de absorbancia obtenidos a dos longitudes de onda específicamente seleccionadas de manera que el pico conocido de interés sea suprimido registrando la absorbancia diferencial en función del tiempo de elución (véase Fig. 23); así cualquier pico residual que se observe en el cromatograma de supresión espectral, representará un componente que eluye simultáneamente y cuyas características espectrales

difieren a las dos longitudes de onda seleccionadas. La figuras 23 y 24 describe el método propuesto por Fell, A.F. et.al. (43).

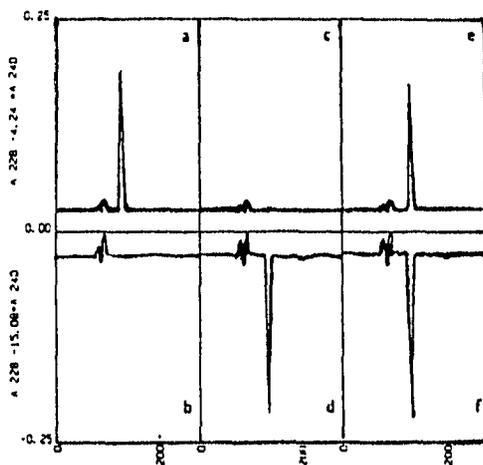


Fig. 23. Cromatogramas con supresión de espectro para Tyr sin resolver y DOPA.

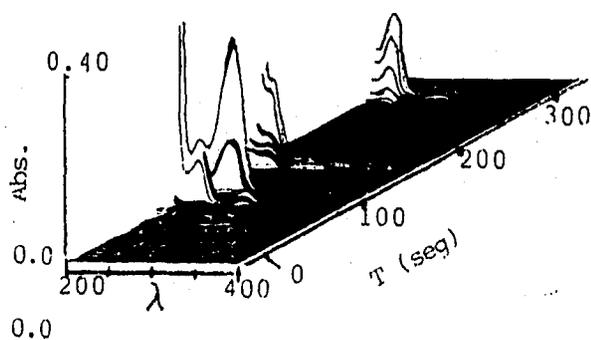


Fig. 24. Espectrocromograma pseudo isométrico de a.á aromáticos y sus metabolitos.

Capítulo V

Errores innatos del metabolismo de aminoácidos: aminoacidopatías

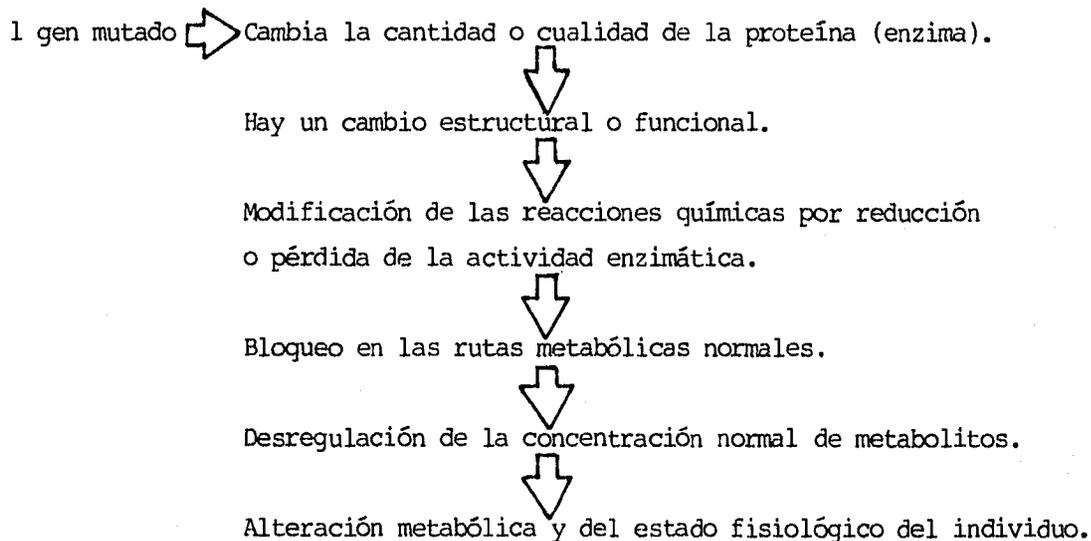
V. ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO DE AMINOACIDOS: AMINOACIDOPATIAS.

Los errores innatos del metabolismo se definen como desórdenes bioquímicos, genéticamente determinados debidos a defectos congénitos específicos, en la estructura o función de las moléculas proteínicas y por tanto de las enzimas (45).

Las vías metabólicas están constituídas por series de reacciones químicas específicas, las cuales se efectúan gracias a la actividad de las enzimas, por lo cual, al carecer de una enzima o que esté modificada, traerá como consecuencia un transtorno o bloqueo en la vía metabólica correspondiente (46).

Una enzima puede estar modificada, en su forma o su función por la mutación del gen que codifica para la misma, es decir:

1 gen = 1 enzima



Debido a que cada reacción bioquímica está bajo control de un único y diferente gen, la mutación de un solo gen da como resultado la incapacidad de la célula de llevar a cabo una reacción única y primaria (45).

Estos defectos genéticos se heredan en forma Mendeliana o monogénica (es decir, por medio de un solo gen), y dado que ésto provocará una modificación en

la enzima correspondiente habrá un bloqueo en las rutas metabólicas normales (47).

Algunas manifestaciones clínicas de las enfermedades originadas por errores innatos del metabolismo son: trastornos neurológicos, problemas alimenticios, metabolitos alterados (detectados por análisis clínicos); por tanto, algunas de estas manifestaciones deben considerarse como sospechas clínicas de un error innato y tratar de efectuar un diagnóstico a tiempo (48).

Las aminoacidopatías y las acidemias orgánicas son los errores innatos del metabolismo más comunes en el período neonatal. (En la Rep. Fed. Alemana. 1:5,000 nacidos vivos presentan una aminoacidopatía) (49).

Las aminoacidopatías son errores innatos del metabolismo de aminoácidos (EIMA), en las cuales el metabolito de concentración elevada es un aminoácido.

Generalmente las aminoacidopatías no se diagnostican a tiempo, sino más bien al observar los síntomas, sin embargo, un diagnóstico temprano puede prevenir daños neurológicos y cerebrales (mentales) en los niños, por lo cual es mejor disponer de un diagnóstico a tiempo para poder proveer a los enfermos el tratamiento adecuado (49, 50).

El principal tratamiento a pacientes con aminoacidopatías es el suministrarles dietas modificadas de proteínas (51). Es decir, desde la infancia temprana (1-14 años) se prescribe una dieta ajustada restringiendo el aminoácido que de acuerdo a la enfermedad esté impedido, se busca fijar un nivel de tolerancia infantil a tal (o tales) aminoácidos, para lograr un ajuste de los niveles de aminoácidos, lo más cercano posible a los normales (50, 52). Cuando no se ha determinado a ciencia cierta la aminoacidopatía se debe de administrar glucosa por vía intravenosa, con la finalidad de mantener el aporte calórico y prevenir convulsiones y daño cerebral (53).

Existe un gran número de aminoacidopatías (Véase la Tabla No. 8), sin embargo por ser modelos importantes desarrollaremos las tres siguientes:

1. Fenilcetonuria
2. Enfermedad de Orina en Jarabe de Maple (Arce)
3. Homocistinuria

5.1 FENILCETONURIA

La Fenilcetonuria (PKU) o hiperfenilalaninemia clásica, también llamada Enfermedad de Fölling, es una aminoacidopatía hereditaria de carácter autosómico recesivo; es decir una enfermedad congénita por un error innato del metabolismo de la Phe, causada por una actividad deficiente de la enzima hepática: Fenilalanina hidroxilasa (PAH)(54, 55) la cual transforma la Phe en Tyr, en condiciones normales (56, 57). La Figura 25 presenta estas reacciones metabólicas (45,46,55).

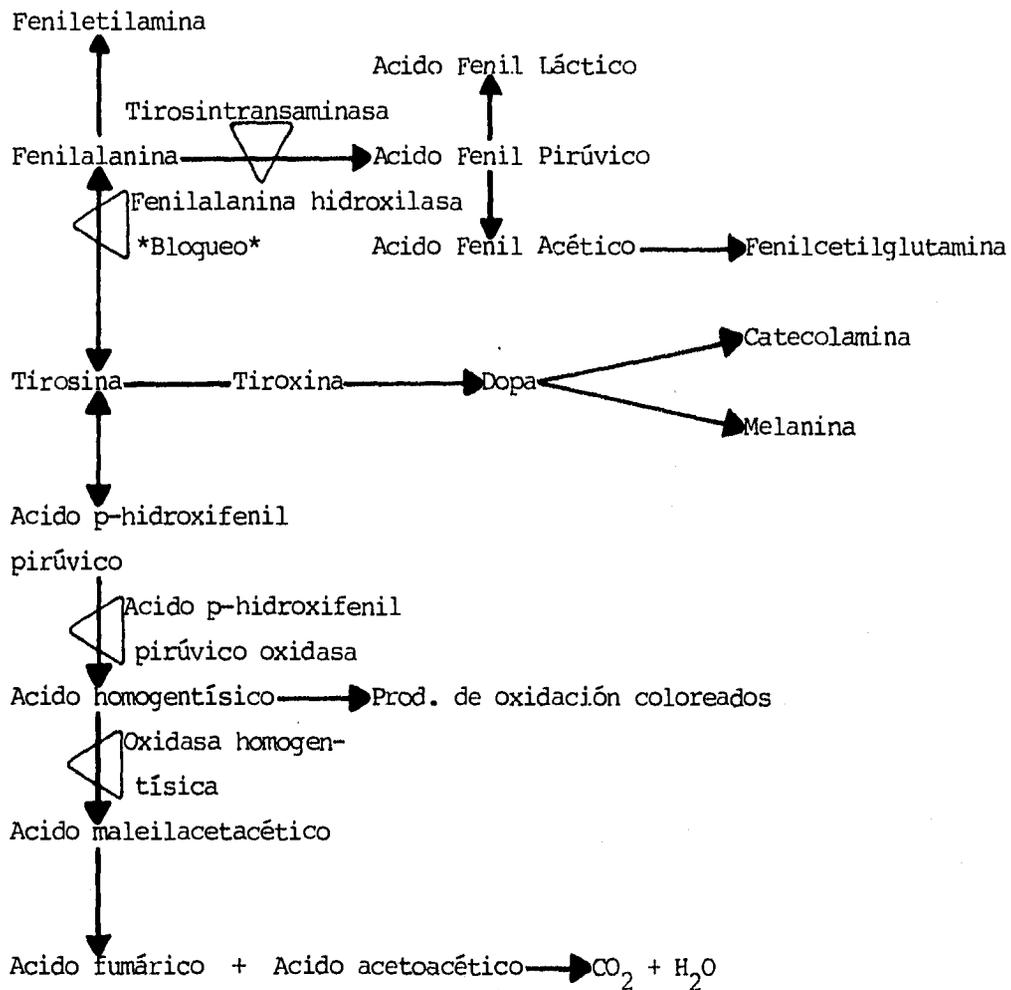


Fig. 25. Reacciones del metabolismo de la Phe, en la cual se observa el bloqueo de la ruta por parte de la PAH.

El enfermo no puede convertir la Phe en Tyr, y por tanto produce catabolitos alternativos a la Phe: Acido fenil pirúvico (producto de desaminación de la Phe), Acido fenil láctico (Reducción del ácido fenil pirúvico) y el ácido fenil acético (por descarboxilación y oxidación del ácido fenil pirúvico); el ácido fenil acético se conjuga con la Gln y se excreta como fenil cetil glutamina (54,55).

Debido a la presencia del ceto ácido fenil pirúvico (ácido fenil pirúvico) en la orina se denomina PKU(46).

La PKU es el EIMA más común (56), un 1% de los retrasados mentales padecen esta enfermedad, y la frecuencia varía de acuerdo a las condiciones etno-geográficas entre 5 a 350 por millon de nacidos vivos; la frecuencia en algunos países es la siguiente: Irlanda 1:4,000, Israel 1:20,000, U.S.A. 1:14.000 (55) y México (1:20,000) nacidos vivos (58).

Se ha analizado el DNA genómico y se han localizado más de 100 diferentes mutaciones importantes asociadas a la PKU, de los cuales las mutaciones correspondientes a la PAH, se encuentran en el cromosoma 12 región q22-q24.1, (90Kb,13 exones), (54, 59).

Existe una acumulación anormal de la Phe en estos enfermos; la concentración sérica normal de Phe es de 1-1.4mg/100ml o 26-61 μ M, mientras que en los PKU's es superior a los 40-60mg/100ml, o a 1000 μ M (45, 54).

Las condiciones básicas para que se manifieste la PKU son: que exista una mutación en la PAH (Factor Genético) y que el individuo tenga contacto con la Phe (Factor Ambiental), (54).

Los síntomas en el enfermo son los siguientes, (45,46,54,55,60):

- Olor suigeneris en los recién nacidos.
- Vómitos repetidos
- Posteriormente, retraso mental profundo aparente en los primeros meses de vida.
- Desarrollo cognitivo impar.

- Complicaciones neurológicas: Electroencefalograma anormal.
- Deficiencia de Neurotransmisores.
- Crisis convulsivas
- Hipercinesia
- Autismo
- Poca pigmentación en la piel, ojos y cabello (por disminución en la síntesis de melanina a partir de la dopa).
- Tendencia a dermatitis eczematosas desde la lactancia en un 50% de los niños.

Anteriormente, los hijos de mujeres fenilcetonúricas padecían retraso mental y microcefalia, además de cardiopatías congénitas y anomalías esqueléticas, por haber estado "in utero" sometidos a concentraciones altas de Phe; pero actualmente si se someten a un tratamiento meticuloso y mantienen sus niveles sanguíneos de Phe por debajo de 6mg % pueden parir hijos completamente normales, sin daño teratógeno causado por la Phe (54, 58).

Lo descrito anteriormente corresponde a la PKU clásica, la cual comprende el 97% de los casos, sin embargo existen otros tipos de hiperfenilalaninemia o PKU no clásica, que se describen en el la tabla 8.

Un diagnóstico neonatal, o perinatal de PKU, el cual ya es posible en la actualidad, puede prevenir la aparición de trastornos neurológicos y algunos otros síntomas, sin embargo si no se diagnostica a tiempo no se pueden prevenir los daños neurológicos (54). El tratamiento a las personas afectadas es una dieta en base a hidrolizados proteínicos con mezclas de aminoácidos que excluyan la Phe y que se suplan con azúcares, lípidos, vitaminas y minerales (de manera comercial se maneja la leche PHENEX-1 y 2), (58). Lo que se busca es reducir los niveles de Phe y mantener un nivel lo más próximo al normal, lo cual si se logra a tiempo, prevendrá la aparición de trastornos neuroógicos, eczematosos y principalmente el retraso mental.

5.2 ENFERMEDAD DE ORINA EN JARABE DE MAPLE (ARCE).

La enfermedad de Orina en Jarabe de Maple o Arce (EOJM), también llamada cetoaciduria de aminoácidos de cadena ramificada, recibe su nombre del característico olor a caramelo en la orina. Se trata de un trastorno metabólico congénito (error innato - autosómico recesivo) en la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR): Val, Leu e Ile. Estos aminoácidos y sus correspondientes alfa-cetoácidos se excretan en grandes cantidades por la orina (véase Fig. 26), lo que genera el olor característico a la miel de maple o azúcar quemada (Principalmente la Ile y su cetoácido); También las concentraciones séricas son muy elevadas. El defecto bioquímico de esta enfermedad es la falta o reducción de la actividad enzimática del complejo deshidrogenasa BCKAD, el cual cataliza la conversión de los 3 alfa-cetoácidos de cadena ramificada en bióxido de carbono y tioésteres del acetyl CoA (45, 54, 55). Estas reacciones se muestran en la Fig. 26 (54, 55).

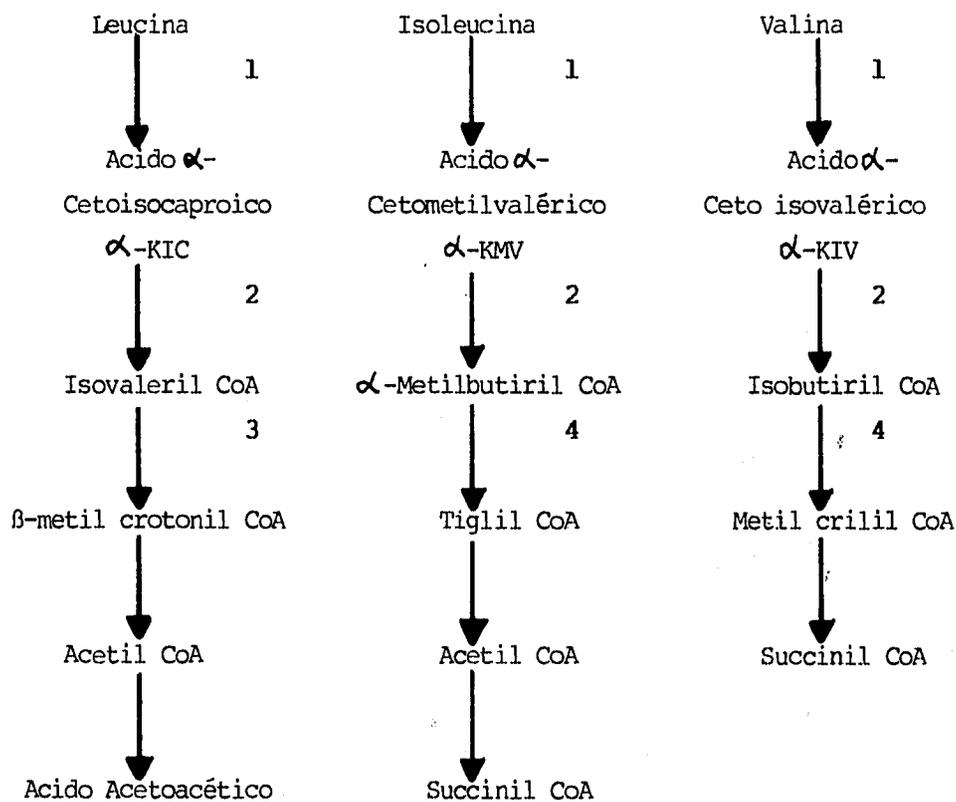


Fig. 26. Reacciones enzimáticas correspondientes al metabolismo de los AACR (Val, Leu, Ile).

Enzimas implicadas:

- 1 Aminotransferasas
- 2 α - Cetoácido deshidrogenasa
- 3 Isovaleril CoA deshidrogenasa
- 4 Acil CoA dehidrogenasa

Por medio de diversos estudios se ha demostrado la heterogeneidad genética de la EOJM, y se sabe de 6 (loci) que contribuyen al complejo BCKAD, el cual se ha clasificado en 4 fenotipos moleculares basados en el locus afectado (54):

- TIPO IA- Mutación en el gen E1
- TIPO IB- Mutación en el gen E1 β
- TIPO II- Mutación en el gen E2
- TIPO III- Mutación en el gen E3

El complejo humano BCKAD está asociado con la membrana interna de la mitocondria. Este complejo multienzimático es una macromolécula que comprende 3 componentes catalíticos; un fosfato de tiamina (TPP) dependiente de la descarboxilasa, o E1, con una estructura $\alpha_2\beta_2$; una transacilasa o E2, que contiene 24 polipéptidos y una deshidrogenasa o E3, la cual es una flavoproteína de estructura homodimérica. Además el complejo BCKAD contiene 2 enzimas reguladoras, una cinasa y una fosfatasa, las cuales controlan la actividad enzimática a través de una fosforilación reversible (inactivación), y un mecanismo de desfosforilación (activación), (54).

Generalmente la actividad enzimática del complejo BCKAD (estudiada en cultivos de fibroblastos o linfoblastos) está reducida hasta rangos de menos de 2% con respecto a la actividad normal.

Se han clonado todos los segmentos de cDNA E1, E1 β , E2, E3 y la cinasa específica y se lograron asignar los genes humanos del complejo BCKAD a diferentes cromosomas (59,61):

- E1 - Al cromosoma 19 q13.1-q13.2
- E1 β - Al cromosoma 6 p21-22
- E2 - Al cromosoma 1 p1
- E3 - Al cromosoma 7 q31-q32

La frecuencia de esta enfermedad es de 1:185,000 a nacidos vivos, con variaciones etnogeográficas importantes como es el caso de los Menonitas, Líbano, Lancaster y Pensilvania la cual es de 1:176 nacidos vivos. Los niveles plasmáticos de los a.á. involucrados se encuentran en la Tabla No. 7 (45, 54):

Tabla No. 7. Concentraciones séricas normales y anormales de los AACR.

<u>AMINOACIDO</u>	<u>CONC. SERICA NORMAL(%)</u>	<u>CONCENTRACION SERICA DE ENFERMOS CON EOJM (%)</u>
Isoleucina	0.8-1.5	2.2-17.9
Leucina	1.5-3.0	14.5-52.4
Valina	2.0-3.0	13.1-23.9

Los síntomas principales de esta enfermedad son los siguientes (54, 62, 63):

- 1.- Los recién nacidos no manifiestan alguna patología específica, sino después de 3 a 6 días de haber nacido.
- 2.- La orina de los recién nacidos presenta un olor característico (como azúcar quemada)
- 3.- Dificultades de alimentación, vómitos y rechazo al alimento (62).
- 4.- Pérdida progresiva del reflejo de moro.
- 5.- Episodios frecuentes de hipoglicemia (63).
- 6.- Crisis convulsivas frecuentes.
- 7.- Letargia y coma.
- 8.- Rigidez de decerebración con ópistonos
- 9.- Daños a nivel del Sistema Nervioso Central y daño cerebral si no se detecta a tiempo (antes de 1 mes de vida).
- 10.- Pueden aparecer trastornos en el crecimiento.
- 11.- Son muy sensibles a infecciones y estres (62).
- 12.- Los enfermos pueden fallecer en las primeras semanas de vida si no se tratan de forma adecuada.
- 13.- Entre los principales hallazgos histopatológicos se encuentran: trastorno de la mielinización, vacuolización edematosa de la mielina con gliosis y astrocitosis.

El tratamiento que se debe dar a las personas afectadas con EOJM debe de manejar una dieta adecuada por un tiempo prolongado y una intervención agresiva durante una descompensación metabólica aguda. Estos dos puntos reducen la morbilidad, mortalidad y el tiempo de hospitalización. La edad del diagnóstico y el subsecuente control metabólico, son factores determinantes, ya que los pacientes que se tratan después de 10 días de edad, raramente pueden tener un intelecto normal (54, 58).

Debido a lo que se mencionó anteriormente, las personas afectadas por esta enfermedad deben de alimentarse con una dieta sintética sin aminoácidos de cadena ramificada (AACR), (Leu, Ile y Val), lo cual puede prevenir el daño neurológico y prolongar el tiempo de vida. Algunos trastornos en el crecimiento que suelen presentarse en estos pacientes mejoran con la administración de levadura (45, 54, 58). Un tratamiento temprano (neonatal) con polivitaminas, minerales y elementos traza por 18 meses reactiva parcialmente los sistemas enzimáticos deficientes y se vuelven a tener concentraciones normales de Val y de glucosa en suero y orina (63). En pacientes de un año de edad es menos efectivo, por lo cual al igual que la fenilcetonuria, se debe diagnosticar de forma neonatal, para poder evitar los trastornos que produce esta enfermedad y tratar de reactivar el sistema enzimático deficiente. También se puede dar tratamiento con tiamina (de 50-300mg/día) por lo menos durante 3 semanas para observar si la enfermedad es tiamina dependiente o no, si resulta ser dependiente la administración de tiamina con una dieta de restricción de los AACR, resulta ser muy efectiva (54).

Además se recomienda que los enfermos no estén sometidos a estrés, se prevengan todo tipo de enfermedades y especialmente las infecciones y la fiebre.

Si el paciente llega a tener niveles tóxicos de metabolitos plasmáticos, pueden requerir de ser tratados mediante terapia de líquidos; diálisis peritoneal o hemodiálisis (58).

Se pretende que en un futuro no muy lejano se pueda tratar esta enfermedad mediante terapia génica con el fin de poder restaurar el defecto metabólico desde su origen

La mayor parte de los pacientes clásicos no tratados mueren en los primeros meses de vida debido a crisis metabólicas recurrentes y deterioro neurológico.

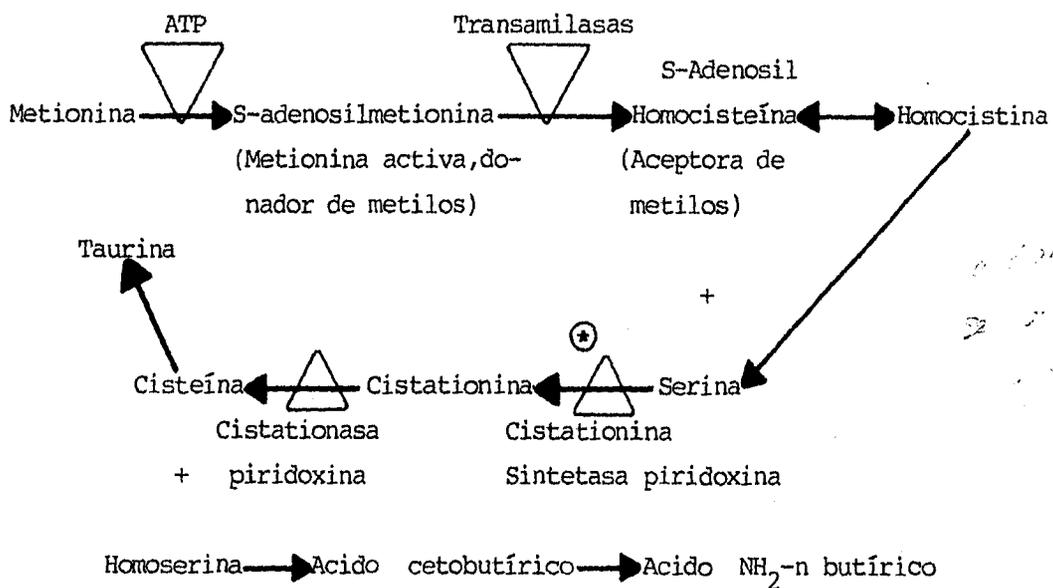
Se ha descrito una forma variante de esta enfermedad: cetonuria intermitente de aminoácidos de cadena ramificada. Los signos y síntomas, pueden no aparecer por meses o años de haber nacido y son de carácter intermitente. El niño se desarrolla normalmente, pero puede morir durante un ataque inesperado (54).

Por último es importante mencionar que las mujeres que padecen EOJM, no debían embarazarse, debido a que el producto presentaba graves afecciones, sin embargo ya se pudo lograr un embarazo exitoso de una paciente que padecía de esta enfermedad y que dio a luz un hijo sano, por medio de un tratamiento dietético estricto, y observación cuidadosa por parte del médico (54).

5.3 HOMOCISTINURIA

La homocistinuria es una enfermedad de tipo autosómico recesivo (aunque hay evidencias que sugieren considerable heterogeneidad genética) producida por un defecto hereditario del catabolismo de la Met. Esta enfermedad es el error innato del metabolismo de aminoácidos más frecuente después de la PKU, en Estados Unidos es de 1:160,000 nacidos vivos (45, 46, 55).

La baja actividad de la enzima cistationina β -sintetasa (CBS), la cual produce cistationina a partir de homocisteína y serina, lo que trae como consecuencia la elevación de los niveles urinarios de homocisteína y Met (54). El aumento en la concentración normal de homocisteína produce la formación de disulfuro de homocistina y la conversión de homocisteína en homocistina, los cuales son excretados en grandes cantidades en la orina, también se encuentra incrementada la concentración de metionina a nivel sanguíneo. Las reacciones metabólicas que se llevan a cabo se presentan en la Fig. 27 (45).



⊛ Bloqueo; Enzima deficiente (CBS).

Fig. 27. Reacciones del metabolismo de la metionina, en las cuales se puede observar la enzima bloqueada en la homocistinuria.

Algunos enfermos presentan poca actividad de la CBS, otros, presentan actividad nula en la CBS. La enfermedad se clasifica de acuerdo a la respuesta que presentan los pacientes a la administración de piridoxina en: piridoxina dependiente y piridoxina no dependiente; en los primeros se ha observado que hay una mejoría clínica y posiblemente se deba a que éstos presenten una actividad baja en la CBS y que en su forma activa (fosfato de piridoxal), actúe como su coenzima (54, 55).

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son las siguientes (45, 54):

- 1.- Los recién nacidos tienen aspecto relativamente normal.
- 2.- Anormalidades oculares:
 - a. Primaria: Ectopia lentis
 - b. Secundaria: Glaucoma, miopía, desprendimiento de retina, cataratas.
También pueden sufrir atrofia del nervio óptico.
- 3.- Alteraciones en el tejido conjuntivo:
 - a. Generalmente observadas: Osteoporosis y Genu valgum.
 - b. Frecuentemente observadas: Hábitus marfanoide; Dollicostenomelia, Pes cavus, Pies planos, Escoliosis, Pectus excavatum, Aracnodactilia.
- 4.- Signos del sistema nervioso central:
 - a. Frecuentemente observado: Retraso mental progresivo (en más del 50% de los enfermos)
 - b. Ocasionalmente observados: Electroencefalograma anormal, crisis convulsivas.
- 5.- Anormalidades del sistema cardiovascular (observadas frecuentemente): Tromboembolias, trombosis arteriales y venosas, trombosis cerebrales, renales, de la cava y embolias pulmonares.
- 6.- Tienen el cabello anormal en algunas ocasiones: rubio, quebradizo, delgado y escaso.
- 7.- Pueden presentar mejillas enrojecidas, maloclusión dental y marcha de andadera por debilidad de la musculatura pelviana.

El tratamiento generalmente consiste en administrar una dieta hipoproteínica, baja en Met con suplemento de cistina, para los pacientes no dependientes de la piridoxina, ya que por el bloqueo metabólico existente este a.á. no se produce. Para los pacientes dependientes de la piridoxina además de

administrar una dieta baja en Met y alta en cistina se les administra piridoxina en dosis suprafarmacológicas. Los fenómenos tromboembólicos se tratan de prevenir mediante la administración de aspirina y con betaína en los no dependientes (54,58).

Los cromosomas afectados en la Homocistinuria son lp 36.3 en el caso de la forma clásica y el cromosoma 21q22.3 para el caso de la forma vitamina B₆ dependiente (59).

Al igual que sucede con las otras aminoacidopatías, un diagnóstico a tiempo y su correspondiente tratamiento, puede prevenir la aparición de los síntomas clínicos de esta enfermedad, principalmente el retraso mental irreversible (60).

Existe una variante de esta enfermedad, en la cual la enzima bloqueada es la N₅metilen tetrahidrofolato metilen transferasa. En esta variante las concentraciones de homocistina y de Met en plasma son bajas. Generalmente el defecto puede corregirse mediante la administración de dosis suprafarmacológicas de su coenzima: la vitamina B₁₂ y el ácido tetrahidrofólico. Este padecimiento se cree que puede generarse por malabsorción o por metabolismo deficiente de la vitamina B₁₂ (54).

5.4 COMPENDIO DE AMINOACIDOPATIAS

Todas las demás aminoacidopatías se encuentran descritas en forma más concreta que las anteriores en la Tabla No.8 (45, 54, 55, 57, 59, 61, 64 a la 78).

Tabla No. 8 COMPENDIO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO DE AMINOACIDOS: AMINOACIDOPATIAS

SINDROME O ENFERMEDAD	ENZIMA ANORMAL	METABOLITOS ELEVADOS	GENES DEFICIENTES	CARACTERIZADA POR:	TRATAMIENTO
HIPERFENILALANINEMIA	1. tetrahidrobiopterina (BH) 2. dihidropteridina (DHPR) 3. 4-carbinolamínodeshidrasa 4. deficiencia de la GTP-CH o GTPG.	fenilalanina	1. gen de la BH 2. DHPR-4p15.13 3. 4 -10q 21 4. GTP-CH 14q21-q22	<ul style="list-style-type: none"> ser menos grave que la fenilcetonuria clásica. deficiencia de neurotransmisores; retraso mental: C.I. 70. a niveles sanguíneos normales de Phe, el sujeto puede ser normal 	<ul style="list-style-type: none"> bajar los niveles de Phe lo más cercano a la normalidad; administrar dosis farmacológicas de BH₄ suplementar con L-dopa; 5-hidroxitriptófano y carbidopa como inhibidor de la descarboxilasa; suplementos de ác. fólico
HISTIDINEMIA	histidasa	histidina (Ac. imidazol-pirúvico) histidasa residual en piel	12 q 24	<ul style="list-style-type: none"> crecimiento retardado, lengua farfullada. daño cerebral y del S.N.C. retraso mental (50% de los casos); fotosensibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> dieta baja en histidina. Sin embargo los daños cerebrales parecen neon.
HIPERGLICINEMIA a. cetósica b. no cetósica primaria tardía	glicina formil FH transferasa complejo enzimático intramitochondrial: 80% prot. P, H, T y L proteína H o T	Gly, Ser, Ala, y Glu. cociente de glicina LCR/S	prot. p9 p24 - p23 9 p 22 prot. T-3p 21.2 p 21.1	<ul style="list-style-type: none"> vómico, cetosis, retraso mental, neutropenia, infecciones paraplejía, convulsiones, deshidratación, apnea y muerte mioclonías y retraso mental 	<ul style="list-style-type: none"> tratamiento dietético con restricción de glicina administrar ác. fólico para reducir la Gly. y bloquear el receptor N-metil D-aspartato administración de diazepam, y dextroretorfanol
HIPERLISINEMIA a. tipo I (periódica con hiperamonemia)	prot. -aminoadípico semialdehído sintasa	Lys, Gin y ác. pipecólico		<ul style="list-style-type: none"> retraso mental, intoxicación amoniacal, crisis convulsivas, coma, dificultad para hablar, problemas de motricidad, hiperpipecolatemia, S. de Zellweger 	<ul style="list-style-type: none"> terapia de fluidos restricción de lisina restricción proteínicas

Tabla No. 8 CONTINUACION.

SINDROME O ENFERMEDAD	ENZIMA ANORMAL	METABOLITOS ELEVADOS	GENES DEFICIENTES	CARACTERIZADA POR:	TRATAMIENTO
HIPERLISINEMIA b. tipo II (persistente sin hiperamonemia)	lisina cetoglutarato reductasa sist. multienzimático: lisinilacilasa, lisin deshidrogenasa, y L-lisina NAD oxidoreductasa.	ornitina, Lys y Arg.		. retraso mental, crisis convulsivas, sacaropinuria	. terapia de fluidos . restricción de lisina . restricción proteínica
HIPERPROLINEMIA a. tipo I b. tipo II	prolina oxidasa prolina 5-carboxilato deshidrogenasa (P-5-CD)	Pro, hidroxiprolina y Gly. Pro, P-5-CD		. daño renal y crisis convulsivas . retraso mental, disfunción del S.N.C., crisis convulsivas y electroencefalograma anormal.	. no se ha detectado el aduado, la restricción de prolina en la dieta (para la tipo I) resulta poco exitosa; es ineficaz en el caso de la tipo II
HIPERTIROSINEMIA a. tipo I o tirosinemia hepatorenal b. tipo II o Síndrome de Richner Hartart : . def. de la PHPPD hereditaria . Hawkinsuria . tirosinemia transiente en neonatos	deficiencia de la fumarilacetacetato hidrolasa (FAH) tirosina aminotransferasa: TAT 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (PHPPD) disfunción autosomal dominante de la PHPPD inmadurez de la PHPPD	Tyr, Met, succinilacetona, succinilacetico, p-OH-fenil láctico, p-OH fenil pirúvico Tyr Tyr. y 4-hidroxifenil derivados * Tyr, hawkinsina, * Tyr	15q 23-q-25 16q 22.1-q-22.3	. disfunción hepática, cirrosis, carcinoma hepatocelular, síndrome renal de Falconi, glomeruloesclerosis, crisis de neuropatía periférica: diarrea, vómito, melenas, hepatomegalia, raquitismo . anomalía neurológica, problemas oculocutáneos como erosiones corneales, hiperqueratosis. Retraso mental moderado o medio I D E M . disfunción del S.N.C., específica para cada paciente . desarrollo normal; asintomática que con el tiempo genera efectos adversos	. restricción de Phe y Tyr; trasplante de hígado para prevenir crisis neurológicas; adun. de NHEC ** un inhibidor de la PHEE que mejora la función renal y hepática . dieta con restricción de fenilalanina y tirosina . dieta con restricción proteínica y adun. de asorbato . adun. de asorbato y dieta de restricción proteínica

Tabla No. 8 CONTINUACION.

ESTA TABLA DEBE SER
VALIDA SE ...

79

SINDROME O ENFERMEDAD	ENZIMA ANORMAL	METABOLITOS ELEVADOS	GENES DEFICIENTES	CARACTERIZADA POR:	TRATAMIENTO
DEFECTOS DEL CICLO DE LA UREA a. b. c. d. e.	. carbamil fosfato sintetasa (CPSD) . transcarnilasa de la ornitina (OTCD) . ác. arginosuccínico sintetasa (ASD) . arginosuccinasa (ALD) . arginasa	. NH ₃ y Gln . amoníaco . amoníaco . amoníaco . amoníaco	2p X p21.1 7 cen q 11.2 7 cen q 11.2 6 q 23	. del tipo a - d: neonatos normales de 24 a 48 hrs. posteriormente presentan hipotermia, letargo progresivo, encefalopatía, apnea, edema cerebral y astrocitos, acumulación intragiliar de Gln, cambios mentales y de comportamiento. . quadriplejia espástica progresiva, retraso mental	. restricción proteínica, principalmente de Gln . para las formas a, b y c, tratar con fenil butirato (activa la síntesis de fenil acil glutamina que permite desechar N ₂) . en la c y d, suplementar con Arg (promueve la síntesis de citrulina y arginosuccinato para desechar N ₂)
HIDROXIPROLINEMIA	hidroxiprolina oxidasa	hidroxiprolina		. retraso mental, aminoaciduria.	. restricción de hidroxiprolina
CISTATIONURIA		cistationina	cromosoma 16	. retraso mental, en algunos casos pueden ser normales.	. administrar altas dosis de vitamina B ₆
ALCAPTONURIA	. homogentisica ácido oxidasa	ác. homogentísico	3 q 2	. aciduria, artritis, ocronosis, coloración negraza en orina.	. restricción de Phe, tratar la artritis sintomáticamente; admin. vit. C
ACIDEMIA PROPIÓNICA	. propionil CoA carboxilasa	ác. propiónico y propionato, Gly, Ile, Val, NH ₃ , ác. metilmalónico	13 q 32	. cetoacidosis neonatal, hiperamonemia, trastornos infecciosos, crisis convulsivas, coma.	. dieta hipoproteínica (0.5 - 1.5 g/kg /día; dieta baja en Gly, Ieu y Tre . reemplazo alcalino
HIPERORNITINEMIA a. con atrofia de la girasa de la retina y coaroides	. ornitín -amino transferasa (OAT)	ornitina, Glu, Gln, Lys, creatina y creatinina	10 q 26 OAT Xp10 Xp21	. vómito, retraso mental, degeneración progresiva coroidal y de la retina, miopía, ceguera nocturna y eventual, visión de túnel	. fosfato de piridoxal o piridoxina; dieta con restricción de Arg . admin. de dosis farmacológicas de Lys o -ác. amino butírico, Phe y creatina

Tabla No. 8. CONTINUACION.

SINDROME O ENFERMEDAD	ENZIMA ANORMAL	METABOLITOS ELEVADOS	GENES DEFICIENTES	CARACTERIZADA POR:	TRATAMIENTO
HIPERORNITINEMIA b. hiperornitinemia, hiperamonemia, homocitruinuria (HHH)	ornitina descarboxilasa (ODC) y ornitina transcarbamilasa (OTC)	ornitina	Xp 21.1	. nel. Posteriormente: cataratas subcapsulares, degeneración c6ric retinal, agregados tubulares en m6sculo esquel6tico. . hiperamonemia y des6rdenes en el C. de la urea, problemas de visi6n y fondo ocular at6picos	. dieta con restricci6n prote6nica
ACIDURIA METILMALONICA a. Vit. B ₁₂ no dependiente b. Vit. B dependiente	apoenzima metilmalonil-CoA mutasa 5'desoxiadenosil cobalamina (no se sintetiza)	ac. metilmal6nico ac. metilmal6nico	6p 21	. cetoacidosis metab6lica, v6mitos, deshidrataci6n, coma, retraso mental y de crecimiento. hepatomegalia . puede manifestarse desde el periodo neonatal, hasta edades superiores a 1 a6o de vida; el 70 % de los casos tratados, sobreviven sin retraso mental	. dieta hipoprote6nica . administrar Vit. B ₁₂
ACIDURIA GLUTAMICA		Glu.	tipo IIA 15q23-q25 tipo IIB Chr 19 tipo IIC 4q32q ter	. cabello escaso, 6spero, despigmentado; retraso mental, crecimiento retardado, malformaciones cong6nitas	
HIPER-ALANINEMIA	4-aminobutirato, -ceto-glutarato aminotransferasa	-alanina, taurina, 4 AiB, GABA		. desarrollo neurol6gico y s6ctico impar	. administraci6n de piridoxina
DEPENDENCIA A LA PIRIDOXINA CON CONVULSIONES	6c. glut6mico descarboxilasa cerebral	GABA		. convulsiones, crisis; el metabolismo de la vit. B ₆ es normal	. dosis farmacol6gicas de piridoxina

Tabla No. 8 CONTINUACION.

SINDROME O ENFERMEDAD	ENZIMA ANORMAL	METABOLITOS ELEVADOS	GENES DEFICIENTES	CARACTERIZADA POR:	TRATAMIENTO
DEFICIENCIA DE LA GABA TRANSAMINASA	4-aminobutirato, -ceto_ glutarato aminotransfera_ sa	GABA		<ul style="list-style-type: none"> . función impar del S.N.C . crecimiento lineal acelerado . aumento en los niveles plasmá_ ticos de la hormona del creci_ miento . homeostasis impar del GABA y de la -alanina 	. ninguno
ACIDURIA 4-HIDROXIBU_ TIRICA . (SSAD DEFICIENCIA)	deshidrogenasa del semial_ dehído succínico	4-hidroxi <u>buti</u> _ rato		<ul style="list-style-type: none"> . signos cerebrales . hipotonía muscular . retraso mental 	

* p-hidroxifenil láctico, p-hidroxifenil pirúvico y p-hidroxifenil acético

** 2-(2-nitro- -trifluorometil benzóil) 1,3-ciclohexanodiona

Capítulo VI

Diagnóstico clínico de aminoacidopatías

VI. DIAGNOSTICO CLINICO DE AMINOACIDOPATIAS

6.1 INTRODUCCION

En este capítulo nos enfocaremos al seguimiento que se debe de dar a un paciente con la finalidad de que se diagnostique cualquier aminoacidopatía, sin intervenir en las técnicas de análisis, sino más bien en los tipos de pruebas que se deben de realizar para lograr un diagnóstico adecuado de un Error Inato del Metabolismo de Aminoácidos (EIMA).

En primer término describiremos la forma en que se da el seguimiento general para el diagnóstico de cualquier EIMA, y posteriormente describiremos con más detalle las formas de diagnóstico de los tres EIMA tratados en el capítulo anterior con mayor detalle (PKU, EOJM y Homocistinuria).

Para un diagnóstico acertado y además a tiempo, se debería realizar a todo neonato un Tamiz Neonatal (TN), mediante el cual a partir de muestras de sangre recolectadas por gotas en papel filtro se realizan diferentes análisis con el fin de detectar anomalías en algunos metabolitos (niveles más altos o más bajos de los normales). En nuestro país a nivel de hospitales públicos de acuerdo al Diario Oficial de la Federación, obliga la realización de un TN para la prevención del retraso mental (79), sin embargo en este TN únicamente se rastrea el Hipotiroidismo Congénito y no todas las enfermedades metabólicas detectables (como los EIMA) por medio de este método. Dado lo anterior, en nuestro país a nivel de hospitales públicos un diagnóstico a tiempo se realiza básicamente manteniendo una constante observación del neonato, estando al tanto de cualquier síntoma extraño, que pueda indicar la necesidad de la realización de un Tamiz Metabólico (TM) (58, 64). Esto se logra mediante el trabajo conjunto de todo el personal de salud, ya que todo este equipo debe de ser muy observador y cauteloso, pues su papel es fundamental en la detección de un EIMA.

En primer lugar, el médico deberá de estar al tanto del historial familiar, por ejemplo; consanguinidad, historia de abortos repetidos o de hijos fallecidos en etapas neonatales temprana, y si se sospecha de un posible EIMA deberá de solicitar la realización de un TM completo al neonato (48); además de

que el mismo médico deberá de dar asesoramiento genético para tratar de evitar que este EIMA reaparezca en otro miembro de la familia, o bien, para que los padres conozcan el riesgo de recurrencia del mismo (58).

Se debe de tener singular atención en los neonatos para registrar: Bajo peso en el recién nacido, pretérmino, si se presentaron dificultades perinatales, si el neonato presenta anomalías físicas generales, signos oculares, anomalías cardíacas, anomalías gastrointestinales, y si se han detectado anomalías nefrológicas o radiológicas (64).

Además a todo neonato se le deben de registrar los siguientes datos: Fecha de nacimiento, peso, talla y se les debe de practicar un análisis general sanguíneo que contenga las mediciones de : Porcentaje de hemoglobina, Hematocrito, Leucocitos, Segmentados, Reticulocitos, Linfocitos, Plaquetas, Tiempo de Prototrombina, Albúmina, Globulina, Colesterol, Ferritina, y Glucosa. Un indicativo de un posible EIMA puede ser la concentración de Hemoglobina (Hb) plasmática, ya que se ha observado que cuando los niveles de Ala, Leu, Val, Phe y Glu en sangre están por encima de los niveles normales se tiene un decremento de los niveles de hemoglobina plasmática (80). Otro indicativo puede ser una hipoglicemia, ya que una baja en los niveles de glucosa puede estar asociado a una deficiencia en el metabolismo de los a.á. (53).

Además se deberá de observar al paciente en busca de las siguientes manifestaciones: Olor "sui generis", rechazo a los alimentos, vómito, hipotonía, letargia, coma, convulsiones de difícil control y visceromegalia (48).

Si se detecta alguna de las manifestaciones anteriores de inmediato se deberán de tomar muestras de sangre y orina para realizar un TM (58):

1. En primer lugar se realiza una punción con una lanceta estéril en el talón o el dedo pulgar (hasta los 4 meses de edad) o en la mano si son mayores de 4 meses, se debe eliminar la primera gota de sangre y la segunda se debe de poner en contacto con una targeta de papel filtro especial (diseñada especialmente para tomar correctamente las muestras; veáse Fig. 28), para que ésta se impregne por completo, y así sucesivamente hasta impregnar los demás círculos de la targeta (81). Se recomienda que se ingiera una dieta rica en proteínas de

2 a 4 horas (como máximo), antes de la toma de la muestra.

<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Fecha _____
Nombre _____			Hospital _____

Fig. 28. Tarjeta de papel filtro para la toma de muestra de sangre para T.M.

2. Según los resultados de las pruebas de TN, se deberá de obtener una muestra de sangre para HPLC, mediante punción venosa, para obtener de 1 a 2 ml. de sangre, de la cual se obtiene el plasma por centrifugación y se congela. Al igual que en el caso anterior se recomienda tomarla de 2 a 4 hrs. después de haber ingerido una dieta rica en proteínas. Además se debe de recolectar orina de 2 a 4 horas posteriores a la ingestión de un dieta alta en proteínas, y se debe congelar de inmediato (58).

Con estas dos muestras se realizan las pruebas de TM iniciales o de primer nivel que consisten en (58):

- Bililabstix (tiras reactivas)
- Pruebas químicas: DNPH, Azul de Toluidina, CTAB
- Cromatografía uni y bidimensional de a.á. en sangre y en orina

Además de las prebas anteriores, las muestras se pueden utilizar para cuantificar a los aminoácidos por medio de HPLC o Cromatografía de Gases con Espectroscopía de Masas (CGEM) y poder diagnosticar o descartar un EIMA (82).

En el caso de los EIMA un incremento anormal de la concentración de cualquier aminoácido con respecto a los valores de referencia (véase Tabla No. 9), indicará que existe algún EIMA y que de acuerdo al tipo de metabolito incrementado, será necesario realizar un estudio enzimático en el cual se busca medir la actividad de la enzima afectada con el fin de poder determinar el tratamiento más adecuado al paciente (83). La actividad enzimática se puede medir de forma in vitro o de manera indirecta in vivo en el paciente; Para medir la actividad in vitro de la enzima se utilizan cultivos de células y se mide la actividad enzimática ante el sustrato (54). La forma in vivo indirecta, es de acuerdo a la respuesta que presente el paciente ante una dieta

proteínica, con el fin de inferir qué tan afectada está la actividad enzimática en base a su respuesta (58).

Por último, después de realizar un estudio enzimático y determinar la actividad de la enzima, se deberá realizar en el paciente un estudio de tipo molecular, en el cual se realice un análisis mutacional para determinar la enfermedad.

TABLA No. 9

VALORES DE REFERENCIA DE CONCENTRACIONES NORMALES DE AMINOACIDOS (μM)

1. Glu	23-250	9. Val	128-283
2. Ser + His	103-197	10. Met	11-16
3. Gln	57-464	11. Ile	26-94
4. Gly + Thr	159-318	12. Leu	45-155
5. Arg	26-86	13. Phe	26-61
6. Ala	137-305	14. Ornitina	10-107
7. Tyr	31-71	15. Lys	71-151
8. Tau	57-115	16. Otros	

Fuente: Valores dados por la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría (58).

En E.U. se realizó un estudio de costo beneficio entre las pruebas neonatales realizadas por HPLC para poder detectar un EIMA tomando en cuenta los costos de hospital, pruebas y diagnóstico (tomando en cuenta las posibles complicaciones), con respecto al costo beneficio de remitir al neonato con un especialista, la pérdida de tiempo, y que este mismo especialista posteriormente recurra a un análisis para cuantificar aminoácidos; Se concluyó que es de mucho mayor costo-beneficio para el pediatra y para el implicado, mandarlo a un especialista que realizar de inmediato un análisis mediante HPLC de intercambio iónico utilizando sangre seca colectada en papel filtro (el cual puede realizarse hasta en 3 minutos) para diagnosticar a tiempo un EIMA (84, 85).

Estos análisis de cuantificación de aminoácidos también se pueden realizar por medio de CGEM, HPLC con previa derivatización de aminoácidos utilizando 9-

fluorenil metil cloroformato y con detector de fluorescencia, los cuales son muy sensibles, rápidos y totalmente automatizados (86).

En E.U. es obligatoria la realización de un Tamiz Metabólico Neonatal, con el fin de buscar entre otras enfermedades EIMA (45, 54) y así poder detectarlas a tiempo y poder evitar los problemas que éstas generan, principalmente retraso mental (50). Dado que, como ya se mencionó, en México no buscan EIMA en el TN, la mayoría de los PKU no se diagnostican a tiempo (87, 88).

6.2 DIAGNOSTICO DE FENILCETONURIA (PKU)

Los signos indicativos de la PKU pueden ser los siguientes (45, 54, 64):

1. Olor característico en la orina del neonato a sudor rancio o a ratón mojado.
2. Dermatitis en zonas expuestas al sol.
3. Poca pigmentación en cabello y piel.
4. Convulsiones.
5. Hiperactividad o agresividad.
6. Retraso Mental.
7. Aminoaciduria.
8. Elevación Phe en plasma.
9. Anemia.

El análisis de laboratorio para la cuantificación de Phe se realiza por medio de HPLC y Fluorometría (89, 64), midiendo la cantidad de Phe en plasma, la cual en adultos es de $58 \pm 15 \mu\text{M}$, en niños es de $62 \pm 18 \mu\text{M}$ y en adolescentes de $60 \pm 13 \mu\text{M}$; en promedio se busca que la concentración de Phe no sea superior de 26 a $61 \mu\text{M}$ y la concentración de Tyr de entre 50 y $140 \mu\text{M}$ (58). Generalmente las concentraciones de Phe de pacientes con PKU exceden las $1000 \mu\text{M}$. También se pueden realizar análisis por medio de cromatografía en capa fina tanto uni como bidimensional (54).

Además se deben de medir las pterinas (Neopterina, Biopterina y Tetrahidrobiopterina o BH_4 , con el fin de determinar si el paciente presenta hiperfenilalaninemia clásica (también llamada PKU), o padece otro tipo de hiperfenilalaninemia (54). También pueden medirse los Neuro Transmisores (NT)

tanto en orina como en plasma, ya que una concentración baja de NF, refuerza el diagnóstico de PKU (45, 54, 55).

Posteriormente se debe medir la actividad enzimática de la PAH, y posteriormente proceder al estudio genético para determinar su origen (58).

El diagnóstico perinatal de PKU es factible mediante pruebas enzimáticas de la PAH realizadas por medio de amniocitos cultivados y células de hígado fetal obtenidas mediante una biopsia intrauterina de hígado. También, utilizando amniocitos, se puede determinar el genotipo enzimático mediante técnicas de análisis de DNA y marcaje polimórfico. Estas pruebas se deben realizar cuando el feto tiene de 19 semanas de vida o más (54, 86).

6.3 DIAGNOSTICO DE ENFERMEDAD DE ORINA EN JARABE DE MAPLE (EOJM)

Los signos indicativos del EOJM pueden ser los siguientes (54, 64):

1. Olor característico del cerumen y orina a miel de maple.
2. Pérdida del apetito.
3. Vómitos.
4. Irritabilidad, apatía.
5. Coma o letargia neonatal
6. Pérdida o poca ganancia de peso.
7. Temblores en las extremidades.
8. Retraso Mental.
9. Aminoaciduria ramificada.
10. Descamación de la piel por períodos prolongados.
11. Presencia de dermatitis en las áreas del pañal o acrales.

Los análisis de laboratorio que se deben de realizar para poder diagnosticar EOJM, son básicamente para cuantificar los α -cetoácidos de cadena ramificada los cuales están incrementados por encima de los valores normales de referencia (cetonuria)(54, 82), y la concentración de glucosa, la cual generalmente es inferior a la normal (hipoglucemia)(63). Para la cuantificación de los Aminoácidos de Cadena Ramificada (AACR) en sangre, generalmente se utiliza HPLC, y cromatografía en capa fina uni y bidimensional (54, 58, 85); también existe otro método indirecto para identificar una concentración alta de

leucina mediante la inhibición del crecimiento bacteriano del B. subtilis producida al adicionar gotas de sangre con concentración alta en leucina al cultivo, por lo cual si se produce inhibición del crecimiento se sabe que hay presencia de leucina en concentraciones altas (54). El nivel de leucina en sangre en un enfermo de EOJM es mayor a 4mg/dl o 305 μ M en las primeras 24 horas (58). Generalmente se diagnostican las formas clásicas de EOJM, la forma intermedia y la E₃ deficiente. Algunos pacientes con la forma intermedia tienen los niveles de leucina bajos, por lo cual no se pueden diagnosticar de forma neonata, sino posteriormente, lo mismo sucede con la forma dependiente de la tiamina (54).

Se recomienda no solamente cuantificar los aminoácidos, sino obtener un perfil completo tanto de aminoácidos como de ácidos orgánicos a partir de muestras ya sea de sangre en papel filtro, de fluido cerebroespinal u orina, por medio de CGEM. Si las muestras tienen concentraciones altas de aloisoleucina (formada por la racemización de la L-isoleucina en una tautomería ceto-enol y transaminación por parte de la aminotransferasa de los AACR), Ésto es indicativo de EOJM (54).

Cuando ya se ha diagnosticado la EOJM en base a la concentración alta de los AACR y sus correspondientes cetoácidos, se procede a realizar el estudio enzimático de la actividad del complejo BCKAD en cultivos de células (fibroblastos o linfoblastos) de los pacientes (47, 58).

Finalmente se procede a realizar el estudio genético para conocer el genotipo e identificar el origen de la enfermedad (58).

Al igual que la PKU, la EOJM, puede ser diagnosticada de forma perinatal, en fetos de 14 a 18 meses de gestación, obtenido amniocitos y villus coriónicos, realizando con estas pruebas enzimáticas para ver la actividad del complejo BCKAD y para detectar los segmentos mutantes por medio de estudios del cDNA utilizando PCR (54, 88).

6.4 DIAGNOSTICO DE HOMOCISTINURIA

El diagnóstico de homocistinuria está basado en la excreción urinaria de homocisteína y homocistina mayor a 300 mg/24hrs y niveles altos de Met en sangre (metioninemia)(45, 54, 82). La cuantificación de homocisteína, homocistina y Met se puede realizar en muestras de sangre u orina por HPLC, CGEM y CCF uni y bidimensional (58).

Cuando ya se diagnosticó la homocistinuria a partir de los niveles elevados de homocisteína, homocistina y Met, se procede a la realización del estudio enzimático para saber en primer lugar si la enfermedad es de tipo piridoxina dependiente o no dependiente y para conocer la actividad enzimática de la CBS para saber si presenta una actividad impar, o si tiene una deficiencia total, o si es una deficiencia en la Vitamina B₆, o una deficiencia de la misma célula para tomar la Vitamina B₁₂ (V.B₁₂), o si los lisosomas tienen la incapacidad de liberar la V.B₁₂, o una deficiencia celular para convertir la V.B₁₂ a metil adenosil B₁₂ (54).

Finalmente se realiza un estudio molecular con el fin de conocer la mutación causal de la enfermedad (58).

Capítulo VII

Abuso en el consumo de aminoácidos y sus consecuencias metabólicas

VII. ABUSO EN EL CONSUMO DE AMINOACIDOS Y SUS CONSECUENCIAS METABOLICAS.

7.1 INTRODUCCION

Entre 1906 y 1912, Willcock y Hpokin por una parte, y Osborne y Mendel, descubrieron que diversos a.á. constituían nutrimentos esenciales para el desarrollo del ser vivo. De aquí que los primeros estudios en los que se administraban grandes dosis únicas de aminoácidos o los experimentos de corta duración, tenían el único objetivo de producir elevadas cantidades de varios productos metabólicos. Posteriormente, conforme la información nutricional y metabólica aumentaba, los efectos de la administración crónica de grandes cantidades de aminoácidos individuales recibieron mayor atención. En estos estudios el objetivo primordial fue determinar la tolerancia de los a.á. como nutrimentos esenciales, así como conocer las consecuencias patológicas y farmacológicas de su ingestión excesiva.

La proporción de a.á. presentes en la dieta de un organismo suele desviarse de la proporción en la cual son requeridos fisiológicamente por el mismo (Tabla 10). Se sabe que tanto el crecimiento como la eficiencia en la utilización de las proteínas, son funciones directas de la cantidad disponible del "a.á.-limitante del crecimiento", independientemente de la cantidad presente de otros a.á. que pueden proveerse en exceso. Así, si el término "desproporción" se emplea para indicar la desviación del patrón normal de a.á. presentes en la dieta, el ingerir cantidades variables de ellos, no conducirá forzosamente a que se presenten efectos adversos. Dichos efectos como tal, son observados comúnmente bajo condiciones experimentales en las que se pretende crear desproporciones mucho mayores de las que pudieran encontrarse comúnmente de forma natural. Situaciones parecidas, pueden, sin embargo, ocurrir de manera natural con sujetos cuya susceptibilidad a cierta cantidad de a.á. aumenta debido a daños en el hígado y los riñones (90), malnutrición, abuso en su consumo, o a la presencia de defectos genéticos en el metabolismo de los mismos (91). Lo anterior sugiere que los efectos adversos producidos por ingerir dietas que contengan cantidades desproporcionadas de a.á., ocurran cuando los mecanismos homeostáticos de regulación en sangre y en fluidos corporales son deficientes, presentan algún defecto, o se sobrecargan artificialmente.

Tabla No. 10
 REQUERIMIENTOS DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS
 CALCULADOS PARA EL HOMBRE

Requerimiento (mg/kg de peso corporal/día)			
Proteína	LACTANTE (4-6 meses)	NIÑO (10-12 años)	ADULTO
	2,000	1,400	800
Aminoácidos esenciales			
Fenilalanina(y tirosina)	141	22	16
Histidina	33		10
Isoleucina	83	28	12
Leucina	135	42	16
Lisina	99	44	12
Metionina y cisteína	49	22	10
Treonina	68	28	8
Triptófano	21	4	3
Valina	92	25	14

En general las investigaciones a cerca de los efectos producidos por un exceso en el consumo de a.á. en la dieta, han sido estimuladas por la posibilidad de reproducir en animales de experimentación síndromes parecidos a los que se presentan como resultado de EIMA. La información que se presenta a continuación tiene como objetivo describir los defectos adversos que están asociados con la ingestión excesiva de a.á. individuales, los factores que influyen en la gravedad de tales efectos, y en lo posible las bases para los mismos. La mayoría de los a.á. sobre los que se centra la discusión se tratarán individualmente, excepto en los casos que existan relaciones específicas entre grupos de ellos.

Estos efectos van desde disminuciones moderadas en la ingestión del alimento y en el crecimiento, hasta el desarrollo de lesiones patológicas que a

largo plazo han provocado la muerte en algunos animales de experimentación. La mayoría de los efectos adversos más severos se han observado en animales jóvenes en etapa de crecimiento, a los cuales se les ha alimentado con una dieta baja en proteínas y que contiene grandes cantidades de un a.á. en particular. La gravedad de los efectos varía con la naturaleza y el grado de desproporción de los a.á. así como con la edad y el estado fisiológico del organismo (92).

7.2 TOXICIDAD, ANTAGONISMO Y DESBALANCE DE AMINOACIDOS

En general los efectos adversos se engloban en tres grandes grupos: **toxicidad, antagonismo y desbalance de a.á.**, por lo que consideramos importante indicar la diferencia que existe entre cada uno de ellos.

TOXICIDAD DE AMINOACIDOS:

Este término se emplea para describir los efectos adversos producidos como consecuencia de la ingestión de grandes cantidades de a.á. individuales, que por lo general no presentan características comunes (92). Como ejemplo tenemos que la Tyr ingerida en grandes cantidades por ratas jóvenes en etapa de crecimiento, causa lesiones severas en los ojos y patas, así como disminución en su crecimiento. Por otro lado, se ha observado que la Thr es bien tolerada aún en elevadas cantidades produciendo únicamente retraso moderado del crecimiento. De aquí que exista diferencia entre los diversos a.á. en cuanto al nivel necesario para que tales efectos tóxicos tengan lugar (93).

Lewis ha sugerido que casi la mayoría de dichos efectos podrían explicarse al descubrir la existencia de relaciones específicas entre pares de a.á., es decir, relaciones parecidas a las que se dan por antagonismo de a.á.. Por otro lado Russel (94) propone que no existen bases comunes para explicar los efectos adversos producidos por excesivas cantidades de a.á. individuales, más bien dependen de las estructuras particulares y de las relaciones metabólicas de cada uno de ellos.

ANTAGONISMO:

Fue definido a partir del concepto del antimetabolito, que plantea la presencia de análogos estructurales, capaces de sustituir o desplazar el compuesto requerido para el desarrollo de la actividad biológica normal de las coenzimas; de aquí que los análogos de los a.á. pueden competir con los a.á. naturales y causar inhibición de la síntesis proteínica, bloquear alguna reacción enzimática o ejercer competencia por los sitios de transporte. Existe evidencia de que grupos de a.á. naturales son capaces de competir "in-vitro", con otros por sitios de transporte (95), sin embargo existen pocos estudios que comprueben otro tipo de competencia entre ellos.

Ejemplos derivados de estudios en animales indican que la disminución en el crecimiento debida a la ingestión de cantidades excesivas de a.á. pueden aliviarse mediante suplementos de a.á. estructuralmente similares. Estos constituyen antagonismos entre Leu, Ile y Val o entre Lys y Arg. Las bases para los antagonismos descritos no se han establecido aún, sin embargo tampoco se ha comprobado que pertenecen a una acción antimetabólica clásica.

DESBALANCE DE A.A.:

Hier, Graham y Klein en 1944 describieron con el término "desequilibrio o desbalance de a.á.", a la disminución que se produce en el crecimiento de ratas que bajo condiciones experimentales han ingerido una cantidad excesiva de un a.á.; de aquí que los efectos adversos ocasionados bajo condiciones que van desde dietas deficientes en a.á., hasta la ingestión de cantidades excesivas de a.á. individuales, se han generalizado como desequilibrio o desproporción. Ya que cualquier modificación en la composición de a.á. en la dieta, excepto un aumento o disminución proporcional en el total de los mismos, provoca un cambio en cuanto a su balance; el generalizar tal designación puede ser válido y cualquier defecto adverso causado por la modificación del patrón normal en la cantidad de a.á. presentes en la dieta, puede atribuírsele.

El concepto "desbalance de aminoácidos" fue empleado más específicamente entre 1945 y 1953, cuando se le consideró responsable de la disminución en el rango de crecimiento de ratas alimentadas con una dieta proteínica baja y deficiente en ácido nicotínico a la cual se le adicionó una cantidad específica de proteínas deficientes en Trp. La depresión producida en su crecimiento se

detuvo mediante un suplemento de ácido nicotínico o de su precursor (Trp; a.á. limitante del crecimiento), indicando con ello la presencia de un "desbalance". A partir de ese momento se han reportado numerosos ejemplos en los cuales se presentan las mismas consecuencias descritas. Es importante destacar que esta definición no indica el grado de desviación en la proporción de a.á. respecto a los requerimientos normales, sino únicamente cuál es o no la cantidad de a.á. suficiente para causar efectos adversos, con la condición que ninguno de ellos se presente en la concentración a cantidades del ácido limitante, que se considera como el a.á. esencial presente en menor concentración en relación con las necesidades del animal o del ser humano (93).

El prototipo de las dietas empleadas para estudiar desequilibrios en el contenido de a.á. es: que ambas dietas (control y experimental) contengan la misma cantidad del a.á. limitante del crecimiento con la diferencia en que la que represente el desequilibrio, contenga más de los diversos a.á. esenciales que la dieta control (92). Fig. 29.

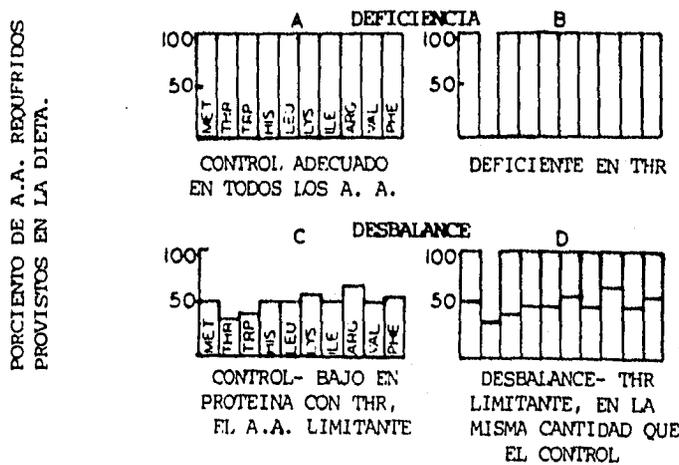


Fig. No. 29.

Diagrama que ilustra la diferencia entre los patrones de a.á. en dietas usadas para estudiar efectos de deficiencias y desbalances de los mismos. A y B difieren en el contenido de a.á. que limita el crecimiento en una deficiencia. C y D muestran dietas con diferente contenido de a.á. (sin limitante) para estudiar sus desbalances.

Existe diferencia entre los términos toxicidad y desbalance. El primer caso se aplica a condiciones en las cuales un efecto adverso se produce debido a grandes excesos de un a.á. individual. La cantidad total de a.á. adicionados con el fin de crear desequilibrios puede ser mayor que las cantidades de a.á. individuales que causan toxicidad, pero usualmente no se incluye un a.á. en una

cantidad tal que por si mismo pueda ser considerado como tóxico.

Por otro lado, el uso del término "desequilibrio o desproporción" se restringe a los a.á. esenciales. Sin embargo, una disminución en el crecimiento puede ser debida también a excesos en a.á. no esenciales con la diferencia de que de éstos se requieren cantidades mucho mayores para producir tales efectos.

Por su parte, antagonismo y "desequilibrio", presentan una diferencia que permite distinguirlos: los efectos producidos por un antagonismo, no pueden prevenirse por un suplemento en el a.á. limitante del crecimiento, únicamente por un a.á. estructuralmente similar a aquel adicionado en exceso.

Los efectos producidos por cantidades desproporcionadas de a.á. dependen de dos factores que deben recordarse cuando se desea extrapolar las observaciones experimentales a situaciones prácticas; éstas son la composición de la dieta y el estado fisiológico y nutricional del organismo:

A) GRADO DE DESPROPORCION: Si hablamos de un grado moderado de desproporción (menor a 5% del a.á. individual en exceso) de a.á. en la dieta, no se encontrarán efectos adversos notables. La mayoría de los experimentos que se refieren al antagonismo y toxicidad de a.á. implican la adición de cantidades mucho mayores a las que se requieren normalmente. Por lo tanto cuando se habla de exceso respecto a toxicidad o antagonismo, la cantidad de a.á. individual añadido a la dieta es por lo menos el doble de la ración requerida para lograr un rápido crecimiento, y usualmente mucho mayor. Si hablamos de desequilibrio, la situación cambia. En ciertas investigaciones las cantidades de a.á. que causan efectos adversos representan un quinto o menos de los requerimiento normales. Dichos efectos atribuidos a desequilibrios por la relación de a.á. antes mencionada, ocurren únicamente en animales alimentados con dietas proteínicamente deficientes. En conclusión, el término "exceso" tiene una base de referencia diferente cuando se aplica al desequilibrio, a la toxicidad o al antagonismo de a.á..

B) EDAD DEL ANIMAL:

Deben considerarse tres puntos en relación a los efectos de la edad en la susceptibilidad de los animales a cantidades desproporcionadas de a.á..

Primero, la cantidad de a.á. que causan efectos adversos se expresa usualmente como "porcentaje de la dieta". Conforme el animal va creciendo, la ingestión de alimento por unidad de peso disminuye, por lo que la ingesta de cada uno de los componentes de una dieta "X", incluyendo cualquiera que cause un efecto adverso, es menor también. Segundo, al mismo tiempo que los requerimientos en a.á. van siendo menores, una dieta inadecuada en proteínas para un animal joven, o lo es para un animal maduro. Si el exceso de algunos a.á. reduce la disponibilidad y la eficiencia en la utilización de los restantes, existe menos probabilidad de que éstos afecten de forma adversa al animal que ingiera a.á. en cantidades que satisfagan o excedan los requerimientos. Finalmente, la actividad de las diversas enzimas involucradas en el catabolismo de a.á., aumenta conforme el animal madura, por lo tanto, la capacidad para degradar un exceso de a.á. que no sean empleados para la síntesis de proteínas, se incrementa también.

De lo anterior debe esperarse que el animal maduro presente un mayor grado de tolerancia a cantidades desproporcionadas de a.á. respecto al animal joven. La capacidad para degradar a.á. tiende a disminuir nuevamente conforme el animal envejece por lo que resultaría interesante conocer si la susceptibilidad de estos animales a un exceso de a.á. aumenta bajo dichas condiciones.

C) TIPO DE DIETA:

La cantidad de a.á. capaces de causar depresiones severas del crecimiento y aún lesiones patológicas en animales alimentados con dietas bajas en proteínas, pueden ser bien toleradas por animales que ingieran dietas adecuadas en proteínas (96). Si la calidad de una dieta baja en proteínas se mejora suplementándola con cierta cantidad del a.á. limitante, la disminución en el crecimiento debida a desproporciones puede prevenirse, mientras que la debida a toxicidad de a.á. se puede eliminar. Sin embargo en los casos agrupados bajo el concepto de antagonismo, los efectos adversos no pueden ser suprimidos a menos que el a.á. limitante del crecimiento sea también el mismo que ingerido en exceso constituye el antagonista. Los efectos adversos de un exceso de Leu, se alivian específicamente incluyendo en la dieta suplementos de Ile y Val (a.á. antagonistas).

Un incremento en la cantidad de proteínas de la dieta, puede ejercer un efecto de protección/prevención a través de dos vías; proporcionando cantidades

adicionales de los a.á. limitantes del crecimiento cuya función es promover el mismo, o suministrando cantidades adicionales de a.á. para los cuales el que se encuentra en exceso es un antagonista o es requerido para el catabolismo del incluido en exceso. A pesar de ello, hay cierta evidencia que indica que si la cantidad del a.á. causante del efecto adverso en animales alimentados con una dieta baja en proteínas, se incrementa en proporción directa al incremento en el contenido de proteína en la dieta, la proteína adicionada no tiene la capacidad de prevenir dicho efecto. Por otra parte, un animal puede tolerar grandes cantidades de a.á. mejor cuando éstos se administran en dietas con alto contenido proteínico, por ejemplo dietas que contengan un 75% de caseína.

Se ha detectado también que la cantidad de algunas vitaminas pertenecientes al complejo B en la dieta, influyen también en el grado de tolerancia a un exceso de a.á. (96). La interacción más estudiada entre a.á. y complejos vitamínicos involucra a la vitamina B₆, cuyo requerimiento se incrementa conforme el contenido de proteína en la dieta aumenta y, consecuentemente los animales alimentados con dietas deficientes en vitamina B₆ toleran menos los excesos de ciertos a.á. que aquellos alimentados con una dieta adecuada. Se han observado resultados similares con el ácido nicotínico, fólico y la vitamina B₁₂. El grado de tolerancia a un desajuste es considerablemente menor cuando el ácido nicotínico no está presente en la dieta.

Algunas investigaciones indican que los carbohidratos complejos, el agar-agar o el agua ejercen efectos indirectos estimulando la ingestión de alimento en ratas alimentadas con una dieta baja en proteína además de que toleran un alto grado de desproporción.

D) DIFERENCIA ENTRE ISOMEROS OPTICOS:

Como regla general los L-a.á. esenciales presentes de forma natural, son menos tolerados en exceso que las formas D-. Un número reducido de D-a.á. puede convertirse con facilidad a la forma L- en el interior del organismo; algunos de ellos pueden excretarse en cantidades apreciables en la orina.

E) ADAPTACION A UN DESEQUILIBRIO DE AMINOACIDOS:

Los animales tienen la capacidad de adaptarse a dietas que constituyen una desproporción de a.á., siempre que el grado de exceso no sea muy grande. Sin embargo no es posible generalizar la adaptación a tales dietas. Se presume que

la adaptación depende de la respuesta enzimática y su capacidad de remover el exceso de a.á. con lo cual se restauran sus concentraciones plasmáticas a los valores normales aunque tales evidencias son limitadas (92).

7.3 TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS EN EL HOMBRE.

La información que existe a cerca de los efectos adversos o tóxicos que se presentan en el hombre como resultado de la ingestión de cantidades excesivas de los a.á. esenciales de forma individual es muy escasa. Algunos a.á. han sido estudiados para ver la posibilidad de emplearlos con fines terapéuticos (97). Dichas investigaciones proveen cierta información a cerca de los efectos que produce la ingestión de estos compuestos en exceso. Se ha administrado Met en cantidades que van desde 10 hasta 20 g/día, durante 5 ó 6 días; Lis.HCl, de 10 a 40 g/día, Tyr e His 20 g/día; Trp, 15 g/día, y Arg.HCl, arriba de 40 g/día. Los resultados reportan únicamente un desorden gástrico medio. Algunos pacientes con enfermedades del hígado presentan cierto daño a nivel neurológico después de ser tratados con Met (98), y otros con daño mental mostraron cambios en su comportamiento (99).

Sin embargo existen numerosos defectos genéticos que pueden aumentar la susceptibilidad de los individuos a un exceso de a.á.; se ha observado también que un exceso, ya sea de proteínas o a.á. puede causar coma hepático (98) en pacientes que presenten un daño severo en el hígado. Por otro lado, si hablamos de dietas en las que el hombre subsista exclusivamente con una rebanada de carne, considerada ésta lo más cercano a la máxima cantidad de proteína que puede ingerirse, podemos decir que está consumiendo de 9 a 18 veces la cantidad de a.á. azufrados que requiere sin presentarse algún efecto adverso.

En el caso de niños, los cuales necesitan una mayor cantidad de a.á. por unidad de peso en comparación con los adultos, el grado de exceso en relación al requerimiento normal aún en una dieta compuesta únicamente por una rebanada de carne, podría ser menor que aquel para los adultos. Se han administrado dosis únicas de casi todos los a.á. esenciales en cantidades ligeramente menores a las provistas por dietas descritas sin que se presenten efectos adversos aparentes, lo cual indica que el cuerpo humano presenta una tolerancia

considerable a un exceso de a.á. individuales.

A partir de todas las observaciones hechas en animales, parece poco probable que el hombre pueda ingerir excesos de a.á. individuales en cantidades suficientes para que produzcan efectos adversos cuando subsiste por una dieta compuesta de forma habitual (alimento natural). La cantidad de a.á. individuales requerida para producir una reacción adversa en un individuo sano, no se encuentra como suplemento de los comestibles. Se requeriría de 10 veces o más el nivel suplementario normal para alcanzar las cantidades que son capaces de producir los efectos descritos, en animales. Solamente si se administran grandes dosis de a.á. individuales con regularidad por alguna razón especial, sería posible alcanzar los niveles tóxicos y a pesar de ello, parece poco factible que los efectos que se generen vayan más allá de un rango medio.

7.4 TOXICIDAD DE AMINOACIDOS INDIVIDUALES

En base a que la mayoría de los estudios relacionados con la toxicidad por un exceso de a.á. se llevan a cabo en animales de experimentación, la información que se presentan en las tablas 11 y 12, constituye una guía general a cerca de la tolerancia que presenta la rata frente a diferentes a.á. en relación a los requerimientos de los mismos en la dieta. La columna que indica la toxicidad relativa, se basa principalmente en la gravedad que se observa respecto a la disminución en el crecimiento del animal cuando se incluyen las mismas cantidades (en peso) de a.á. individuales en una dieta baja en proteínas. La cuantificación resultante de los efectos adversos se basa en la observación de ratas alimentadas con dietas conteniendo un 6% de caseína, sin embargo, resulta importante recordar que la tolerancia a dichas cantidades se ve influida por la composición de la dieta, el estado fisiológico y nutricional del animal, y el tiempo en el que se permita al mismo adaptarse a la dieta.

7.4.1 AMINOACIDOS AROMATICOS

Los efectos que produce la ingestión excesiva de Phe y Tyr han recibido especial atención debido al gran interés que se tiene por desarrollar modelos experimentales para estudiar los EIMA aromáticos. También atraen la atención por ser generalmente los precursores de un amplio grupo de compuestos

biológicamente activos y porque la Tyr es uno de los pocos a.á. que causan un síndrome característico de alta toxicidad cuando dicho a.á. se ingiere en exceso.

Tabla No. 11

Aminoácidos	Requerimiento para ratas destetadas (% en dieta)		% en nivel dietético para lograr efectos adversos.	Toxicidad Relativa [⊙]	% de a.á. adicionados a dieta base de caseína al 70%
	Rose (100a)	Rama Rao et. al. (100b)			
Met	0.6	0.5	2.0	1	2.3
Cistina			3.0	5	0.3
Trp	0.2	0.12	2.0	2	1.1
Thr	0.6	0.5	5.0	8	3.2
Leu	0.9	0.7	2.5	6	7.0
Ile	0.5	0.55	5.0	6	4.7
Val	0.7	0.55	5.0	6	5.2
Phe	0.9	0.9	4.0	4	4.1
Tyr			3.0	3	4.5
Lys	1.0	0.9	5.0	7	5.8
His	0.4	0.26	2.0	3	2.1

⊙ Los números inferiores indican los a.á. que no son bien tolerados en exceso.

Tabla No. 12

Suplemento [⊙]	μl/100 ml de plasma		
	Met	Gly	Ser
Ninguno	15	22	48
+3% Gly	14	384	134
+4.2% L-Ser	13	73	295
+2.7% DL-Met	407	19	47
+2.7% DL-Met +3% Gly	201	190	105
+2.7% DL Met +4.2% L-Ser	238	49	297

⊙ Todas las dietas contenían 10% de Caseína y 0.3% de L-Met.

A) FENILALANINA:

Hier et. al., usando una dieta adecuada y Niven et. al. y Wretlind, empleando una dieta inadecuada en su contenido proteínico, encontraron que un

4% o más en el contenido de Phe ocasionaba una disminución en el crecimiento y la ingestión de alimento en la rata; la forma D- resulta menos tóxica en comparación con la L-Phe (92). El grado de disminución en el crecimiento aumenta directamente con el contenido de Phe en la dieta, y con un 7%, se observa más del 10% de mortalidad en la población durante la primera semana del experimento. El exceso de Phe retardó el crecimiento de la rata en un grado menor al observado cuando:

1. Se mejoró la calidad de la proteína suplementándola con a.á..
2. Se incrementó la cantidad de proteína en la dieta.

Estudios efectuados con hamsters indicaron un comportamiento similar al anterior. Sin embargo, si la cantidad de Phe es superior al 5%, el crecimiento de ambas especies de animales cuya dieta sea adecuada en contenido proteínico, se ve igualmente deprimido; si la cantidad del a.á. se aumenta en igual proporción a la de la proteína, el grado de depresión en el crecimiento permanece constante.

En algunos casos, las ratas alimentadas con dietas que contengan L-Phe (7%), presentan síntomas parecidos a los que se manifiestan en un estado de toxicidad por Tyr (96).

EFECTOS METABOLICOS Y DE COMPORTAMIENTO.

En 1947 se observó (101), que un 5% de D-Phe, eleva la concentración de la misma en plasma de la rata. Tanto las dietas altas en Phe, como las que contengan combinaciones de Phe y Tyr, incrementan la excreción de fenilpiruvato y disminuyen la actividad de la PAH en un 30-50%, signos muy parecidos a los que se observan por sufrir PKU (91). Además, estas dietas parecen causar cierto deterioro en el comportamiento.

Se ha registrado el aumento de Phe y Tyr en el plasma de ratas, hamsters, monos, pollos y en niños (Holt, L.E., Jr. y Snyderman, S.E.) cuando son alimentados con dietas altas en tales a.á.; igualmente se reportan también niveles elevados de Phe en el cerebro, así como el desarrollo anormal de dicho órgano en ratas de 50 días de edad a las que se inyectó Phe. El peso de su

cerebro resultó ser entre 90 y 95% respecto al valor control además que tanto el DNA, RNA y las proteínas cerebelares constituían tres cuartos o menos de las presentes en animales control, ello sugirió que los altos niveles de Phe afectan específicamente al cerebelo.

La relación que existe entre la depresión en la actividad de la PAH y el contenido de Phe en la dieta, es directamente proporcional. Se sabe que la síntesis de dicha enzima se ve suprimida como resultado de un exceso de Phe. La posibilidad de que la disminución en la actividad de la enzima descrita contribuya al aumento de Phe en el plasma de la rata, es remota. Sin embargo, se sabe que la inhibición de la PAH junto con la inyección de Phe, por períodos mayores a 30 días provoca la disminución en el peso del cerebro hasta de 8% detectándose un 25% menos de mielina, cuya composición lipídica se vé igualmente alterada (96).

Otros autores reportan por su parte, que los metabolitos de la Phe inhiben "in vitro" la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (enzima que permite la conversión del 5- hidroxitriptófano en Serotonina, importante neurotransmisor.), con lo cual es posible explicar los bajos niveles de serotonina que presentan los PKU's (91); Yuwiler y Louttit examinando el efecto de una alta concentración en Phe en la dieta enfocándose a la serotonina cerebral se encontró a la edad de 70 días, la serotonina presente en el cerebro, es menor en un 20%. Posteriormente, se reportó que una combinación de 3.75% de Tyr y Phe, disminuyen la serotonina plasmática y un 7% de Phe causa depresión de la serotonina cerebral y hepática, efectos que pueden revertirse cuando el contenido de Trp en la dieta se incrementa de forma considerable. Green et. al. reportaron resultados equivalentes en el caso particular del cerebro pero la concentración de dopamina en el mismo se incrementó mientras que la norepinefrina no sufrió modificación alguna (102).

Las observaciones que indican que un exceso en la ingestión de Phe suprime la concentración de serotonina en varios tejidos se han confirmado ampliamente (92).

Yuwiler et. al. confirmaron que la hidroxilación del Trp en el hígado se ve gravemente deprimida en ratas alimentadas con cantidades elevadas de Phe, sin embargo, no encontraron disminuída la actividad de la 5-hidroxitriptófano

descarboxilasa cerebral. La reacción que se lleva a cabo se muestra en la Fig.30.

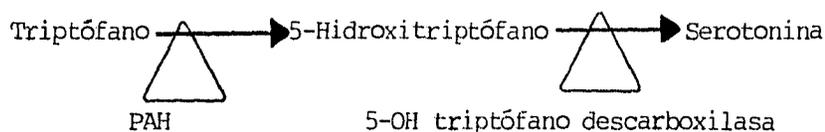


Fig. 30 Reacción de hidroxilación del Trp en el hígado.

Los descubrimientos de Yuwiler resultan de interés en vista del incremento en la concentración de dopamina cerebral en animales alimentados con dietas altas en Phe, ya que la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa puede descarboxilar también a la dopa (dihidroxifenilalanina) Fig. 31.

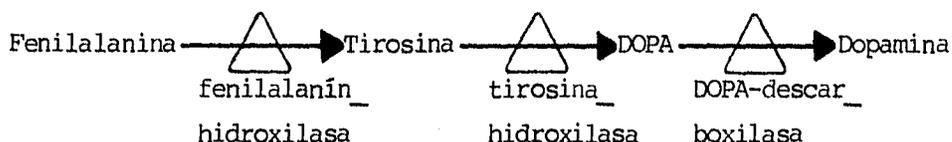


Fig. 31 Reacción de descarboxilación de la DOPA

Finalmente concluye que los mecanismos más viables para que se den los sucesos descritos, incluyen la formación limitada de 5-hidroxitriptófano en tejidos extraneuronales, o un transporte deficiente de este precursor de la serotonina dentro del cerebro (103).

Otros estudios indican que la inyección de Phe en ratas inhibe la respuesta de los anticuerpos al toxoide de la difteria, posiblemente debido a alteraciones en las reservas de a.á. como resultado de la competencia entre la Phe y otros a.á. por los sitios de transporte (92). Se tiene evidencia de que las ratas alimentadas con dietas altas en contenido de Phe presentan alteraciones en los patrones electroforéticos de las proteínas solubles del cerebro además de que la incorporación de a.á. a dichas proteínas, se dificulta. La realización de pruebas directas "in-vitro" ha permitido conocer más ampliamente los efectos que producen altos niveles de Phe en la síntesis de proteínas cerebrales (104). Los resultados muestran una alteración en la cantidad de a.á. libres presentes en células cerebrales incubadas con 14nM de

Phe; ello indica que un exceso del a.á. suprime la captación de a.á. neutros.

Los suplementos de Met, Ile, Leu o Val, son capaces de contrarrestar los efectos del exceso de Phe y mejoran la incorporación de a.á. a las células cerebrales restaurando la síntesis proteínica. Dicho efecto benéfico se logra debido a que un incremento en la concentración de tales a.á., favorece la competencia entre ellos y la Phe, por ser transportados al cerebro y así incorporarse a las proteínas (105).

Se sabe que la exposición del feto a altas concentraciones de Phe afecta considerablemente su desarrollo cerebral; por ello el uso de suplementos dietéticos que incluyan a.á. neutros contrarresta las concentraciones maternas perjudiciales, por el mecanismo descrito previamente.

A través de las investigaciones realizadas puede concluirse que los efectos ocasionados por un exceso de Phe son: La disminución en el peso del cerebro y en el porcentaje de mielina, alteración de la arquitectura celular del cerebelo, aumento de la excreción de Phe y sus metabolitos, depresión de la síntesis de proteínas cerebrales, y cambios en el comportamiento.

Actualmente la literatura que describe los efectos adversos de un exceso de Phe en la dieta, especialmente en anomalías del comportamiento, va en aumento. Estos cambios en el comportamiento de animales como ratas y monos, no se asemejan a la deficiencia mental que ocasiona la PKU. Aún se desconoce con certeza la concentración de Phe o sus metabolitos en el cerebro, que pueda producir algún efecto en el aprendizaje, sin embargo se ha encontrado un significativo aumento (40-50%) en el tiempo requerido por la rata en aprender una tarea específica cuando se ha alimentado de manera simultánea con Phe e inhibidores de la PAH (96).

B) TIROSINA:

Los primeros estudios que se efectuaron para investigar los efectos de la ingestión excesiva de Tyr, datan de antes de 1930 cuando se demostró que en exceso, provocan un efecto nefrotóxico en conejos y perros; causa cambios necróticos en el hígado de conejos y ratas. Posteriormente, en 1932, se observó en la rata, la presencia de un síndrome de toxicidad específica producido por un

exceso de Tyr; los animales alimentados con un porcentaje que fluctúa entre 2.5 y 20% de Tyr en dietas con un 4% de caseína, desarrollaban una hinchazón y enrojecimiento de sus patas además de un exudado pardo-oscuro que se acumulaba alrededor de los ojos. Goldsmith (106) detecta la formación de cataratas, generalmente estas lesiones aparecen entre los 5 y 8 días después de que se inicia la ingestión de dietas altas en Tyr.

La concentración plasmática normal de Tyr en animales es de 0.04 mM, mientras que cuando se les administran dietas proteínicas bajas suplementadas con Tyr (3-5%), se incrementa entre 1.5 y 3.0 mM. De hecho, la alta concentración del a.á. en el ojo (4.7-6.0mM) es la responsable de la formación de cataratas ya que excede su solubilidad en agua @35°C (3.5 mM). Las concentraciones superiores a 3.5 mM inducen precipitación y la formación de cristales dentro de las células de la córnea (96).

Por otra parte, los animales alimentados con Tyr en exceso, pierden peso, disminuye su crecimiento, y el grado de mortalidad es elevado. Se observaron también cambios histopatológicos en la piel, páncreas y riñones cuando se usaban dietas deficientes en proteínas y altas en Tyr. A diferencia de los hechos anteriores, en experimentos con pollos únicamente se detectó disminución en su crecimiento sin que aparecieran signos comparables a los vistos en ratas.

Es importante destacar que la disminución en el crecimiento y la gravedad de las lesiones, es menor después de 2 semanas de iniciar el experimento lo que sugiere que los animales son capaces de adaptarse a la dieta si el porcentaje de Tyr en exceso es moderado (menor a 5%).

La tolerancia a un exceso de Tyr aumenta conforme lo hace el contenido proteínico de la dieta. Así, el aumento desde 6.0 a 15 ó 24% o desde 10.0 hasta 25 o 50%, permite que la disminución del crecimiento sea muy pequeña o aún nula, observándose igualmente efectos preventivos en el desarrollo de lesiones (106), pero si la concentración del a.á. es mayor o igual a 10%, la toxicidad es evidente aún en ratas alimentadas con un contenido proteínico adecuado.

En cuanto a la edad del animal, el adulto es más resistente que el joven; se requieren grandes cantidades de Tyr además de una exposición prolongada a la

misma para producir signos de toxicidad en animales adultos.

Si hablamos de humanos, Goldsmith y Reed (107), reportaron la presencia de signos parecidos a los descritos anteriormente, en un niño con Tirosinemia II. El paciente desarrolló lesiones en la córnea similares a las sufridas por ratas de experimentación además de encontrar erosiones tanto en las puntas de los dedos como en las palmas de las manos. Durante 6 semanas el infante fue tratado con dietas bajas en contenido de Tyr y Phe; ello permitió aliviar la córnea y la lesiones en las manos.

Se ha estudiado también la posibilidad de que la deficiencia en vitaminas esté involucrada en el desarrollo de signos de toxicidad debidos a excesos en la ingestión de Tyr. Se sabe que el ácido ascórbico tienen cierto papel en el metabolismo de la Tyr, sin embargo aunque se añada tanto como un 2% del mismo en una dieta alta en el a.á., los signos tóxicos no son prevenidos (92).

Igualmente, la vitamina B cristalina, en altas dosis, no ejerce un efecto preventivo; sin embargo las ratas alimentadas con dietas deficientes en riboflavina y ácido nicotínico, son mas susceptibles a la Tyr en exceso.

En cuanto a los efectos que tienen los suplementos de a.á. específicos en la toxicidad observada, de forma general la adición de L-Thr, L-Mer más L-Thr o L-Thr más L-Trp, en un porcentaje que fluctúa entre 0.2 y 1.25% para los tres casos, mejora el crecimiento y en muchos casos, la incidencia en el desarrollo de cataratas, se reduce considerablemente pudiendo incluso eliminarse (96).

Resulta interesante el hecho de que una modificación en la fuente de proteínas, por ejemplo de caseína a gluten de trigo, tenga como consecuencia que otro a.á. como la Lys o Lys + Thr sea requerido para prevenir la disminución en el crecimiento y la aparición de lesiones oculares y de las patas en animales de experimentación.

Por lo anterior, es posible sugerir que ya sea el primer o primer y segundo a.á. limitante del crecimiento, ejerzan efectos de protección contra la toxicidad por Tyr (96).

Otras investigaciones indicaron que la administración de hormonas mejora el crecimiento, probablemente porque disminuye la concentración de Tyr en los tejidos. Dicha disminución resulta a su vez, de un aumento en la actividad de la tirosina aminotransferasa TAT (enzima principal en la degradación de Tyr). Sin embargo, algunos estudios demostraron que la tiroxina, que también incrementa la actividad de la enzima descrita, aumenta la concentración de Tyr circulante al doble, con la consecuente depresión en el crecimiento.

El uso de esteroides ha resultado igualmente benéfico para contrarestar los efectos de la Tyr (108) a pesar de que no se detecta un aumento en la actividad de la TAT. Lo anterior permite indicar que la explicación de los efectos ejercidos por cada compuesto estudiado, no puede basarse en un aumento en el catabolismo de la Tyr (96).

OBSERVACIONES METABOLICAS:

La ingestión excesiva de L-Tyr eleva la excreción urinaria del ácido homogentísico en la rata (5), el cual de acuerdo a Bernhardt y Zilliken representa una porción muy pequeña dentro de los metabolitos urinarios de la tirosina en ratas alimentadas con dietas balanceadas.

La actividad de la tirosina transaminasa aumenta en el animal alimentado con un exceso de Tyr (92). Las observaciones anteriores fueron confirmadas al detectar que ratas adultas alimentadas con dietas que contenían un 5% de Tyr, excretaban grandes cantidades de homogentisato, la tirosintransaminasa era elevada y la homogentisatooxidasa se encontró ligeramente deprimida. Una ingestión excesiva de Tyr favorece la actividad de la tirosina transaminasa, pero en ausencia de ácido ascórbico, el producto de la reacción (p-hidroxifenilpiruvato), inhibe la oxidación de la enzima lo que permite la subsecuente acumulación y excreción urinaria del compuesto. La inhibición enzimática puede prevenirse por el suplemento de ácido ascórbico.

BASES PARA LA TOXICIDAD POR UN EXCESO DE TIROSINA:

Los signos de toxicidad por tirosina se asocian con el aumento de su concentración en sangre y en los tejidos. La inclusión de un 5% de ácido p-

hidroxifenilpirúvico en la dieta, disminuye el crecimiento sin que se produzcan signos de toxicidad; por ello, los productos resultantes de la principal ruta metabólica de la oxidación de la Tyr (p-hidroxifenilpiruvato y homogentisato) no son responsables de la toxicidad.

Un exceso de Tyr es capaz de elevar diversos productos metabólicos activos como la epinefrina, norepinefrina y tiroxina. Sin embargo, aún incluyendo un inhibidor de la aminooxidasa en una dieta elevada en Tyr, no se produce aumento en los signos tóxicos como se esperaría si aminas como la epinefrina, norepinefrina o tiramina, fueran las responsables directas de la toxicidad.

Diversos autores (92) coinciden en el hecho de que las interrelaciones tiroides-adrenales, son importantes en el control del metabolismo de la Tyr; sugieren que el balance tiroxina-corticosterona podría contribuir al desarrollo de signos de toxicidad por Tyr; ya que ni el p-hidroxifenil piruvato, ni la tiramina, ni la tiroxina causan signos parecidos a los descritos, es probable que el síndrome se deba a la acumulación de Tyr y que tanto su acumulación como la gravedad de los signos se vean influenciados por el estado en el que se encuentre la tiroides y la corteza suprarrenal del animal.

C) TRIPTOFANO:

Generalmente se considera como uno de los a.á. más tóxicos al ingerirse en exceso. En los estudios iniciales las ratas se alimentaron hasta con un 20% de DL-Trp. en una dieta deficiente en riboflavina. Esa cantidad produjo cambios histopatológicos en los túbulos renales y un 100% de mortalidad a los pocos días. Posteriormente se encontró que la rata tolera bastante bien un porcentaje máximo de Trp. de 1.0 (tanto de la forma L-, como D-), pero si dicho porcentaje se aumenta, ambos isómeros provocan depresión en el crecimiento al combinarse con dietas proteínicamente deficientes. La tolerancia del animal al Trp aumenta conforme el contenido de proteína en la dieta lo hace también. Por otra parte, aunque el exceso de Trp puede ser bien tolerado por una ingesta adecuada en proteínas, existen evidencias que indican que no ocurre lo mismo cuando el hígado del animal está comprometido con otras funciones. Un suplemento de Tyr en ratas de este tipo, les ocasiona pérdida de peso, hepatitis y alteraciones

en la histología del cerebro.

La ingestión excesiva de Trp induce la excreción de xanturenato cuando hay deficiencia de Vitamina B₆ (piridoxina) (109). Esta información permitió realizar pruebas en las que se midiera la excreción urinaria de los metabolitos del Trp. A partir de dichos estudios resulta evidente que el hombre es capaz de tolerar dosis individuales de hasta 10.0 g de DL-Trp semanalmente y durante varias semanas (92). Como es de esperarse, una dieta elevada en Trp y administrada por períodos prolongados, ocasiona una elevación considerable del a.á. en la sangre. Se han encontrado diversos efectos metabólicos de interés que resultan de la ingestión de cantidades elevadas de Trp y que se piensa son consecuencia de tan elevadas concentraciones sanguíneas del mismo.

EFFECTOS METABOLICOS:

La administración de Trp como parte de la dieta, o por vía intraperitoneal, produce un incremento en la actividad de diversas enzimas como: tirosina transaminasa, ornitina transaminasa, treonina dehidratasa, fenilalanina hidroxilasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa. Respecto a la última enzima se ha observado que su actividad "in-vivo" se suprime, ya que la gluconeogénesis (para la cual es un catalizador importante), aparece inhibida en la rata inyectada con Trp.

Pinsky y Geiger (110), reportan que el Trp interfiere en la absorción intestinal de la His; otros estudios sugieren que podría interferir con el transporte de la Phe. Se ha demostrado "In-vitro" la competencia existente entre grupos de a.á. por diversos sitios de transporte, sin embargo "In-vivo", la evidencia que indica la importancia de dicha competencia, es mínima.

Por otro lado, el contenido de serotonina cerebral y en otros tejidos, que disminuye por un alto contenido de Phe, puede prevenirse por un incremento de Trp en la dieta. De tales observaciones se demuestra que la ingestión de Trp en exceso puede incrementar la concentración del neurotransmisor. Se han citado diversos ejemplos de disturbios neurológicos producidos tanto en animales como en el hombre(111); éstos fueron sometidos a una dieta con una cantidad

específica de Trp en conjunción con inhibidores de la MAO; de estas observaciones, se ha sugerido que la triptamina y la serotonina podrían influir en los efectos descritos en animales o sujetos sometidos a dietas con un

contenido alto de Trp. Actualmente, sigue siendo considerable el esfuerzo que se realiza por establecer el papel del Trp y sus metabolitos provenientes de la ruta quinurenina como de la indoleamina, en la etiología y tratamiento de diversos desórdenes neurológicos (112 y 113).

7.4.2 AMINOACIDOS AZUFRADOS:

A) CISTINA:

Se sabe que la adición de niveles de cistina que van de 1.0 a 1.5% o más, en dietas que contienen desde un 18 hasta un 8% de caseína respectivamente, no afecta el crecimiento de las ratas de una manera significativa (92). En cambio, la adición de 2.4% de L-Cisteína (base libre) a una dieta adecuada de proteínas, ocasiona una disminución marcada en el rango de crecimiento de los animales de experimentación, así como 50% de mortalidad en un período de dos semanas después de iniciar el experimento; la adición de 2.5 a 3.75% de L-cistina a una dieta con un 8% de caseína, no causa muerte alguna, únicamente la supresión completa del crecimiento de los animales.

A pesar de lo anterior no puede concluirse de manera definitiva que el aumento en el contenido proteínico de una dieta que contenga un exceso de cistina resulte perjudicial para el animal, ya que se ha reportado que un contenido de 30% de lactoalbúmina y 5% de L-cistina, no ocasiona mortalidad alguna en las ratas, de hecho, aumenta el grado de crecimiento de las mismas hasta en un 85% respecto al control (114).

EFECTOS HISTOPATOLÓGICOS:

Un exceso de cistina afecta en forma muy marcada al hígado y los riñones. Se sabe que la nefrosis causada por niveles de 0.3 a 0.9% de cistina en dietas adecuadas puede prevenirse totalmente por un suplemento de extracto de levadura. Incrementando la cantidad de cistina al 1.1%, se tiene un daño tubular marcado sin que se afecte el glomérulo. Además se reporta necrosis periportal así como la proliferación de células biliares al hígado, cuando se administran dietas con un 6% de L-cistina y 18% de caseína.

La incidencia y gravedad del daño hepático aumenta conforme lo hace el contenido de cistina en la dieta. Los animales que mueren repentinamente después de ser alimentados con niveles altos de cistina sufren hemorragias masivas del hígado que los llevan a la muerte (114).

No se conoce a ciencia cierta el mecanismo por el cual se produce el daño tisular descrito, pero puede concluirse que tanto la necrosis como la cirrosis, no depende del enlace S-S de la cistina, ni de la oxidación del azufre, o de la formación y excreción de grandes cantidades de sulfato en la orina, y tampoco de la presencia de algún grupo amino separado de la molécula de azufre por una cadena de dos carbonos (92).

b) METIONINA:

Los estudios que explican los efectos que causa un exceso de Met se iniciaron al observar que los suplementos de las dietas con Met mejoran el balance de nitrógeno en el perro y el crecimiento de ratas y pollos alimentados con dietas bajas en contenido de a.á. azufrados. La adición de 2.0 a 3.0% de Met reduce de forma sobresaliente el crecimiento y deteriora la utilización de las proteínas, por lo que a dichos niveles resulta tóxica. Sin embargo, la adición de un % mayor al 1% de DL-Met a una dieta que contenga 14% de una mezcla de a.á. esenciales es capaz de mejorar el crecimiento de ratas, sin embargo un 1% adicional, disminuye tal crecimiento hasta en un 50%. Estas, y otras observaciones indican que aunque un suplemento pequeño de Met puede ser con frecuencia benéfico, un incremento del mismo ocasiona la depresión moderada o

severa del crecimiento (92).

Los estudios que pretenden comparar el grado de toxicidad que causa el exceso de diversos a.á. revelan que la Met es el a.á. más tóxico. Las comparaciones están basadas en los efectos que causa la adición de 2 veces los requerimientos de cada a.á. en la dieta (115); por otra parte si comparamos los enantiómeros D y L de la Met tenemos que la forma L resulta más tóxica que la D; en cuanto a daño tisular se refiere.

Se ha logrado provocar efectos tóxicos con cantidades de Met que van desde 2 hasta 12% en dietas con una amplia variación en cuanto a contenido proteínico. Entre 2 y 5% se ha empleado para reproducir los efectos del crecimiento y medianamente a nivel patológico. Mayores niveles se emplean con frecuencia en estudios de efectos histopatológicos.

Parece que un exceso de Met tiende a incrementar el requerimiento de piridoxina, ya que la toxicidad observada en ratas se agrava con la deficiencia de piridoxina. Niveles altos de Met deprimen el crecimiento de ratas alimentadas con dietas deficientes en vitamina B₆ en un grado mayor que el observado en animales alimentados con dietas adecuadas en dicha vitamina.

Las dietas combinadas con vitamina E, B₁₂ y folacina, son benéficas en el caso de ratas alimentadas con 2.5% de Met en una dieta con 10% de caseína.

DAÑO TISULAR:

La ingestión excesiva de Met, causa un incremento en el tamaño del riñón aparentemente como resultado de la dilatación de los túbulos renales. La hipertrofia puede prevenirse parcialmente suplementando la dieta con Arg o Gly. Ambos a.á. previenen de igual manera los cambios que se observan en las células acinares del páncreas.

La L-Met, en niveles del 2 al 4% causa ligeros cambios en las células hepáticas y en el contenido de hierro en el hígado. En este caso, ni la Arg ni la Gly fueron efectivas en la prevención de tal efecto. El depósito de hierro se

produce también en el bazo y como consecuencia dicho órgano sufre oscurecimiento. El depósito parece resultar del reemplazo de los grupos metilo ($-\text{CH}_3$), ya que la alimentación con dietas altas en homocistina no incrementa el contenido de hierro esplénico; además se sabe que los donadores de metilos (colina, betaína, metionín sulfóxido), tienen en esencia el mismo efecto que la Met. Otra hipótesis propone que la acumulación de hierro puede ser el resultado de la degradación de hemoglobina, que a su vez se asocia con la anemia que presentan los animales alimentados con un exceso de Met. La disminución en el número de glóbulos rojos, hemoglobina, y células empaquetadas en animales alimentados con tales dietas, apoya la hipótesis.

Parece que el daño tisular por un exceso moderado de Met, no es permanente, ya que en algunos experimentos los animales se alivian de las lesiones típicas después de tres meses de haberse iniciado el experimento.

Muchos de los cambios que presentan el hígado, bazo y riñones, se han detectado en tres sujetos con hipermetioninemia (116), sin embargo permanece sin conocerse el efecto que tendría un suplemento de Gly o ser debido a la muerte de los mismos.

COMPUESTOS SUPRESORES DE LA TOXICIDAD POR METIONINA:

La adición de algunos a.áa. individuales o de sus combinaciones, pueden ser benéficos para superar la disminución en el crecimiento, provocada por ingestiones excesivas de Met. Como se indicó anteriormente, tanto la Gly como la Ser constituyen una buena opción. Parece que es necesaria algún tipo de adaptación metabólica como prerequisite para lograr estimular el crecimiento de las ratas sometidas a dietas altas de Met cuando éstas se combinan con Gly o Ser. El período de adaptación requiere tres días aproximadamente (92), Véase Fig. 32.

Otros estudios indican que la Arg protege parcialmente a los animales contra la toxicidad observada, y en otras, su combinación con Gly resulta también benéfica. La explicación que se ha propuesto para el efecto que ejerce dicha combinación, es que ambos a.á. son precursores del ácido guanidinoacético

que es capaz de aceptar al grupo metilo de la Met para formar creatina que probablemente aumente el metabolismo del a.á. responsable de los efectos tóxicos. A pesar de lo anterior, posteriormente se probó que es poco probable, principalmente por el hecho que el ácido guanidinoacético es tóxico por sí mismo.

Figura No. 32

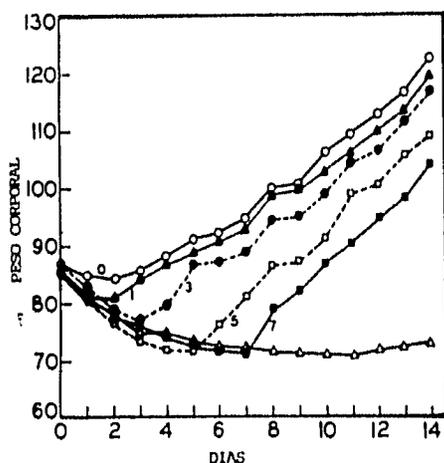


Fig. 32. Efecto en el peso corporal al suplementar una dieta alta en Met con Gly en 0, 1, 3, 5 y 7 días. A las ratas se les permitió comer una dieta control (18% caseína + 0.3% L-Met) por 2 horas diarias durante 2 semanas anteriores al día 0, en el cual recibieron la dieta alta en Met sola (-▲-) o suplementada con Gly. Comenzando en el día 0 (-○-), 1 (-▲-), 3 (-●-), 5 (-□-), 7 (-■-).

Estudios posteriores, (117 y 118) demuestran que un pretratamiento con retinol estimula el crecimiento de los animales de experimentación, independientemente del efecto que se tiene con suplementos de Gly o Ser; sin embargo, al aumentar el % de éstos, los efectos del retinol disminuyen. El mecanismo mediante el cual actúa el retinol, permanece sin conocerse, pero un aumento en la habilidad de la rata para oxidar el formato a CO_2 , después de recibir el pretratamiento con retinol, explica en parte el incremento en la oxidación de Met que favorece su baja concentración plasmática.

Finalmente, se ha podido mostrar que los suplementos de proteínas, confieren ventajas y los efectos benéficos que pueden alcanzarse son menos evidentes cuando el contenido de Met en la dieta, es elevado. Se ha encontrado que las proteínas que tienen a.á. sulfurados en menor cantidad son mas eficaces en la protección contra la disminución en el crecimiento.

EFECTOS METABOLICOS:

Un exceso de Met trae como consecuencia la elevación de dicho a.á. en el plasma y cerebro, hasta 30 veces su valor normal, y en el riñon es 70 veces mayor (92).

La actividad de algunas de las enzimas que participan en el metabolismo de la Met, se modifica debido a cambios en las concentraciones de a.á. azufrados presentes en los fluídos corporales, así como por la acción de las hormonas. Es posible que el consumo de Met en exceso ocasione un aumento en la actividad enzimática mediante un estímulo en la producción de corticosterona. Está demostrado que la adición de Met en una dieta libre de proteína, aumenta el contenido adrenal de corticosterona incrementándose ésta en el plasma (119). Sin embargo, los reportes que avalan tales comportamientos no son consistentes, por lo que se dificulta generalizar dichas observaciones.

CARACTERISTICAS QUIMICAS RELACIONADAS CON LA TOXICIDAD DE LA METIONINA:

Se han realizado numerosos esfuerzos para identificar la parte de la molécula de metionina responsable de la depresión del crecimiento y del daño tisular descrito. Al estudiar los productos metabólicos que se forman como resultado de la degradación de Met, se considera improbable que los metabolitos no sulfurados que se obtienen después de la formación de cistationina, sean los responsables de la toxicidad resultante, ya que la homoserina en un 1.44% no es tóxica y el α -ceto butirato, producto final de metabolismo de la Met, es inocuo.

En base a que la homocisteína es menos tóxica que la Met surgió la posibilidad de que el metabolismo del grupo metilo y, mejor aún del grupo metil-tio, juegue cierto papel en la toxicidad de dicho a.á.. Este último grupo se tomó en cuenta debido a que la Met, S-metil-L-cisteína, y 3-metil-tio-propionato, ocasionan efectos de crecimiento y daño tisular comparables entre sí (96). Sin embargo cuando compuestos como la colina, betaína y sarcosina son incorporados en dietas proteínicamente deficientes no se presentan signos de toxicidad (120).

Por otro lado, reportaron que el metanetiol y el sulfuro de hidrógeno son sustancias sumamente tóxicas y se producen en el metabolismo del 3-metil-tiopropionato, que a su vez se considera como intermediario en una ruta alternativa para la degradación de la Met (121, 122).

Finalmente, existen diferencias importantes que indican que la toxicidad por un exceso de Met tampoco puede atribuirse únicamente a la homocisteína formada como producto metabólico de aquella. Tales diferencias son las siguientes:

- a) La disminución en el crecimiento observada por un exceso de Met es considerablemente mayor que la que se produce con una cantidad equivalente de homocisteína .
- b) Los suplementos de Gly o Ser capaces de aliviar la toxicidad producida por homocisteína, no requieren de un proceso de adaptación del animal, mientras que para la Met ocurre lo contrario.
- c) Los efectos histopatológicos producidos por cada compuesto, son diferentes.
- d) La toxicidad por Met se asocia con altas concentraciones de la misma en sangre y tejidos pero no con altas concentraciones de homocisteína.

De lo anterior podemos concluir que aún permanece incompleta la información capaz de explicar las bases para la toxicidad producida por un exceso de Met.

7.4.3 OTROS AMINOACIDOS ESENCIALES

A) HISTIDINA:

La adición de un 10% de L-histidina, a una dieta adecuada ocasiona disminución en el crecimiento de ratas además de provocar su muerte en un período de 2 meses; si la dieta es deficiente en riboflavina se observa un 100% de mortalidad en menor tiempo (92). Otros estudios demuestran también que un 5% de L-histidina en dietas inadecuadas en contenido proteínico, disminuye igualmente el crecimiento de las especies descritas.

El grado de disminución en el crecimiento provocado por un exceso de His está en función de la calidad y cantidad de la proteína incluida en la dieta.

Como consecuencia, la actividad de las enzimas encargadas de catabolizar la His, es mayor en las ratas alimentadas con dietas proteínicamente moderadas o altas, haciéndose mas factible tolerar el exceso de dicho compuesto.

Además de la disminución en el crecimiento y en la ingestión de alimento se han detectado otros efectos metabólicos asociados al exceso de His: aumenta la cantidad de algunos metabolitos (resultado del catabolismo del a.á.) en los tejidos y en la orina (123) de ratas; uno de éstos es el ácido formiminoglutámico cuya excreción urinaria aumenta bajo las condiciones descritas.

Realizando estudios con pollos, donde la dieta implica un 3% de His, se ha observado que la adición de Gly reduce la gravedad de la disminución en el crecimiento. Por otro lado, si la dieta elegida es baja en contenido proteínico, pero contiene la proporción adecuada de Gly y Arg, se puede suprimir la disminución en el crecimiento.

La concentración plasmática, hepática y cerebral de histidina se eleva cuando dicho a.á. se ingiere en exceso (96).

En los monos jóvenes un exceso de His ocasiona hiperlipemia (92). Dicho fenómeno parece ser exclusivo de la His, ya que la administración de cantidades similares de otros a.á., no lo provocan. Estudios subsecuentes en conejos y ratas reportan que un porcentaje de His comprendido entre 5 y 8%, eleva el colesterol plasmático (40 a 50%) y los fosfolípidos (20 a 50%).

La hipercolesterolemia debida a la His es una consecuencia de la inhibición en la actividad de la enzima lipogénica la cual aumenta la disponibilidad de acetyl-CoA para la biosíntesis de colesterol (109, 124). Otros autores encontraron similitud entre la hipercolesterolemia observada y la que se produce como resultado de alimentar a ratas con dietas deficientes en Cu. Una de las funciones de la His es actuar como ligando de Zn y Cu; en exceso del a.á., la cantidad de Cu unido a la His aumenta, por lo que se genera una deficiencia de Cu libre capaz de desencadenar de igual forma un estado de hipercolesterolemia (96).

Los efectos metabólicos ocasionados por un exceso de His pueden suprimirse suplementando la dieta con retinol o con Met en virtud de que estos compuestos estimulan la oxidación de His con su consecuente disminución en el plasma y los tejidos.

B) TREONINA:

Existen pocos estudios sobre los efectos que produce la ingestión de cantidades desproporcionadas de Thr en algunos animales. El crecimiento de ratas se ve disminuído cuando se les alimenta con una dieta que contenga únicamente a.á. esenciales y un 8% de Thr en su forma DL- (92). Es importante destacar que un 6% de Thr es mucho menos tóxico respecto a la disminución del crecimiento comparado con la depresión que causarían cantidades considerablemente menores (en dietas deficientes en proteína) de a.á. como DL-Trp o L-His. De aquí que se considera un a.á. menos tóxico.

Cierto estudio muestra que la rata puede desarrollar cataratas al ser alimentada con un exceso de Thr. Se sabe que las cataratas se desarrollan en animales alimentados con dietas deficientes en Trp (92), por lo que puede decirse que la Thr en exceso acelera una deficiencia en Trp provocando lo efectos adversos descritos.

Una ingestión prolongada de Thr eleva considerablemente su concentración en plasma. se ha sugerido que las concentraciones plasmáticas elevadas de diversos a.á. ocasionan una depresión en la ingestión de alimento. Esto representa uno de los mecanismos de homeostasis por el cual puede prevenirse la acumulación excesiva de a.á. cuando los patrones de concentración de los mismos se desvían apreciablemente de los valores estándar. La Thr contribuye para que se efectúe el mecanismo homeostático por lo que podría considerarse como uno de los a.á. menos tóxicos (114).

La elevada tolerancia de la rata aun exceso de Thr puede atribuírse al efecto que causan en la ingestión de alimento así como a la fácil oxidación que sufren sus metabolitos.

A partir de las observaciones anteriores pueden obtenerse dos posibles conclusiones sobre el grado de toxicidad de los a.á. ingeridos en exceso:

1. Aquellos que en exceso no causan signos apreciables de toxicidad se diferencian sustancialmente de los altamente tóxicos por su habilidad para deprimir la ingestión de alimento.
2. La disminución en el crecimiento sin que aparezcan signos tóxicos puede ser el primer resultado de una depresión en la ingesta de alimento, debida posiblemente a la elevación en la concentración de a.á. libres, tanto en sangre como en otros fluidos corporales.

Un exceso de Thr no provoca una respuesta de estrés mediada por la corteza adrenal como en el caso de Leu, Gly y Met, ya que no se ha detectado un aumento en la actividad de la Thr dehidratasa hepática, enzima que se eleva considerablemente en ratas a las que se ha administrado glucocorticoides (92).

7.4.4 AMINOACIDOS NO ESENCIALES

A) GLICINA:

Los aspectos que han recibido mayor atención en cuanto a los defectos tóxicos causados por este a.á. son: la calidad y cantidad de proteína y la cantidad de Gly presentes en la dieta; los efectos de la deficiencia de vitaminas específicas y, finalmente la respuesta a los suplementos de otros a.á. cuya finalidad es aliviar los signos tóxicos.

Se ha descrito que las ratas alimentadas con 10% de Gly en una dieta con 4% de caseína, pierden peso lentamente (92). Tres estudios paralelos demostraron que el crecimiento de ratas alimentadas con el mismo porcentaje de Gly en dietas conteniendo 18% de caseína y una cantidad adecuada de vitamina B, no se altera. Ello indica que el grado de toxicidad y depresión del crecimiento provocado por un exceso de Gly depende de la composición de a.á. y el contenido proteínico de la dieta. Se tiene referencia de diversos estudios en los cuales un contenido de Gly de 5%, 10 a 28% de proteína y una cantidad adecuada de vitaminas no ocasiona depresión en el crecimiento de los animales de experimentación.

Las ratas presentan cierto grado de adaptación y tolerancia a la Gly después de un período medio de tiempo (2 semanas aproximadamente). La deficiencia de algunas vitaminas disminuyen la tolerancia del animal a la Gly. Pagé y Gringas encontraron que alimentando ratas con dietas que contenían un suplemento adecuado de Vitamina B, pueden tolerar cantidades superiores a 400 mg diarios de Gly sin que se presenten efectos adversos considerables (125).

Algunos autores reportan que la Vitamina B₁₂ alivia completamente los efectos tóxicos de la Gly, mientras que otros proponen que su combinación con ácido fólico resulta mas efectiva. Los niveles usados de ácido fólico van de 1.0 a 10.0 mg/kg de dieta.

Se han considerado otras vitaminas que puedan influir en la toxicidad por Gly. Tal es el caso de la piridoxina, cuya deficiencia en la dieta aumenta el grado de toxicidad del a.á.. La vitamina E combinada con Met puede prevenir completamente los signos tóxicos de un 4% de un Gly. El efecto benéfico de la Met parece deberse a que los grupos metilo lábiles, se requieren para el metabolismo de la Gly.

A partir de los hechos descritos se han propuesto como bases para la toxicidad ocasionada por Gly las siguientes: nivel proteínico de la dieta, estado vitamínico del animal, disponibilidad de grupos metilo lábiles y productos del metabolismo de la Gly.

B) SERINA:

Los primeros estudios a cerca de sus efectos tóxicos, se realizaron en ratas cuya dieta era deficiente en proteínas y además desprovista de vitamina B. Los resultados indicaron que una alta proporción de éstos animales murieron (92) y aún dietas con un 30% de proteína, fueron incapaces de proteger a las ratas de la toxicidad que causa la DL-Ser. Por el contrario, suplementos de vitamina B, y más aún de piridoxina, resultaron benéficos.

Los efectos de un exceso de Ser incluyen un marcado incremento en la excreción de proteínas urinarias y a.á., lo cual sugiere un efecto directo de la fisiología renal (126). Cabe destacar que dichos efectos se observaron

únicamente con la forma DL-de la Ser y no con cantidades similares del L-isómero. También se han observado daños importantes en la porción distal del túbulo renal, asociado con depósitos de minerales. La adición de cantidades equimolares de homocistina previenen parcialmente el daño.

Entre los agentes más efectivos para prevenir la necrosis renal se tiene a la Met, Gly y Glutación; sin embargo suplementos de piridoxina parecen resultar ineficientes.

La reabsorción de D-Ser a partir del filtrado renal es causante de la necrosis observada. Esta conclusión general se basa en el hecho de que la inyección intramuscular de 50 mg de D-Ser o 110 mg de DL-Ser, provocan anorexia, pérdida de peso y aminoaciduria, mientras que 50 mg de L-Ser no provocan tales efectos (127). Por otra parte, la L-Ser en porcentajes de 2.0 a 6.0%, en dietas que contengan caseína en un 10%, provocan reducción del crecimiento hasta del 29%. A partir de dichas observaciones es posible afirmar que la forma D de la Ser es el agente tóxico responsable de la necrosis renal mientras que el isómero L, administrado en exceso y en dietas proteínicamente deficientes, provoca la disminución en el crecimiento de las ratas (92).

Es poca la información que se tiene a cerca del grado de toxicidad que presentan los intermediarios metabólicos relacionados con el metabolismo de la Ser. Uno de estos compuestos, (hidroxipiruvato) se probó con el fin de evaluar sus efectos en las lesiones renales observando que cantidades equimolares del mismo no causan la lesión típica que provoca la Ser. Una segunda posibilidad contempla que la toxicidad ocasionada por dicho a.á. puede deberse a un incremento en la formación metabólica de Cisteína, ya que encontraron que un porcentaje de 0.3 o 0.9% de cistina en la dieta causa una marcada necrosis renal.

A excepción de la Gly y la Ser, los efectos que causa la ingestión de cantidades desproporcionadas de a.á. no esenciales, han recibido mucho menor atención que los provocados por sus análogos esenciales. En general, los primeros son mucho mejor tolerados en exceso y sus efectos recaen para la mayoría, en la disminución del crecimiento de forma moderada aún con altas cantidades de los mismos.

El Glu es bien tolerado por la rata en cantidades tan altas como 10%, en dietas con un contenido proteínico moderado y aún bajo. Se ha observado la disminución ligera en el crecimiento del animal cuando el porcentaje aumenta de 10 a 20% de L-Glu. Por su parte, la Gln (6%) en dietas adecuadas no ejerce efectos adversos. Para el caso de la Ala, un 5% en dietas inadecuadas, resulta igualmente inofensivo para la rata.

La adición de Pro en un 5% a una dieta inadecuada ocasiona una ligera disminución del crecimiento en la rata, mientras que en los pollos, un 4% del mismo a.á. en dietas adecuadas o deficientes el ácido nicotínico, no provoca efectos adversos.

El crecimiento de las ratas alimentadas con un 5% de L-Asp o L-Asn, en dietas inadecuadas, se afecta hasta un 50%. Además la forma DL-, resulta más tóxica ya que deprime el crecimiento aún cuando la dieta sea balanceada (114). Es importante también considerar la presencia de vitamina B₁₂ y ácido nicotínico para evitar un grado mayor en la disminución del crecimiento.

Cuando se han incluido mezclas de a.á. no esenciales en dietas inadecuadas es posible detectar un fenómeno semejante al producido por un "desequilibrio de a.á." (92). Una mezcla de a.á. no esenciales, exceptuando a la Gly, disminuye el crecimiento de ratas alimentadas con dietas deficientes en proteína y Trp (a.a. capaz de prevenir dicho efecto siempre y cuando no se incluya Gly en la mezcla) Por otra parte, una mezcla de todos los a.á. no esenciales causan un grado menor en la disminución del crecimiento que el causado por una combinación de Pro, Hidroxiprolina y Gly.

7.4.5 D- AMINOACIDOS

Los alimentos que normalmente consumen los organismos vivos contienen xenobióticos (sustancias extrañas no naturales) de importancia nutricional. Los D-a.á. son un claro ejemplo ya que su ocurrencia en las dietas proteínicas, puede aumentar cuando durante el proceso y la preparación de los alimentos, los L-estereoisómeros sufren inversión enzimática (128).

La presencia inusual de las formas D- de los a.á., disminuye la digestibilidad de las proteínas ingeridas y con ello, la disponibilidad de los a.á. que las constituyen.

A partir de este hecho se considera que los D- a.á. constituyen generalmente un efecto nocivo en el campo nutricional. Los organismos contienen únicamente L-a.á. debido a que la síntesis de proteínas es estereoespecífica. Sin embargo, se han encontrado proteínas metabólicamente estables capaces de acumular D-Asp a partir de su L-isómero vía racemización "in-vivo". En la sustancia blanca del cerebro humano, su concentración llega a ser hasta de 3% y de 10% en la mielina purificada (129). De hecho se sabe que el Asp sufre racemización en todos los tejidos humanos aunque por lo general no se acumula en grandes cantidades detectables debido a la rápida inversión de la mayoría de las proteínas (130).

Para tener una idea general sobre la racemización de a.á. se ha estudiado la vida media representativa de la Ser, Asp, Ala, e Ile tanto en su forma libre, como en unión peptídica (97). Estos a.á. se eligieron porque representan el grado de racemización en todos los a.á. proteínicos. Específicamente la vida media de racemización de los a.á. esenciales en el hombre, se encuentra en la tabla 13.

Tabla No. 13
Vida media de racemización de
los aminoácidos esenciales

Aminoácido	100°C pH 7-8 (días)	NaOH 0.1 N 75°C (hr)
Ile, Leu y Val	300	24
Phe y Tyr	50	2-6
Lys	40	8
Trp	40	
Thr	20	2
Met	30	3
Cys	2	30 min

Desde el punto de vista nutricional, la racemización de los a.á. esenciales es muy importante; en los mamíferos los D- isómeros de los a.á. esenciales se utilizan muy escasamente, en algunos casos inhiben el crecimiento, y principalmente se excretan en la orina (131).

A partir de las observaciones en las que los animales alimentados con dietas conteniendo DL- a.á., crecían mas lentamente que aquellos alimentados con los L-isómeros, se originó la hipótesis que supone a los D-enantiómeros como los más tóxicos (92). Sin embargo en el caso de la Tyr, Met y el Glu, las formas L- resultan más tóxicas. Posteriormente en 1950 se reportó que después de un cuidadoso ajuste en el balance de los DL- a.á. en dietas que los contengan, el crecimiento de las ratas alimentadas con una mezcla de DL-a.á., fue equivalente al presentado en ratas alimentadas sólo con L-isómeros. A partir de estos resultados, se cuestionó la afirmación que sostiene un grado mayor de toxicidad de los D-a.á..

En el caso de la Leu y el Asp, las formas DL deprimen en mayor proporción el crecimiento en comparación con el L-isómero. Parece que el D-Asp constituye el único D-isómero claramente mas tóxico que la forma L- (128), ya que su concentración en sangre y la excreción urinaria del mismo en ratas, es mucho más alta en aquellas alimentadas con DL-Asp. Por su parte, la D-Pro tiene un grado de letalidad mayor que su L-enantiómero y a largo plazo, la D-Ser puede causar lesiones renales en ratas. Sin embargo no es posible hacer una generalización al respecto.

GENERACION Y ASPECTOS METABOLICOS DE LOS D-AMINOACIDOS:

La preparación de los alimentos en la cual las proteínas están expuestas por largos períodos, a elevadas temperaturas y/o la acción de álcalis, puede generar cantidades apreciables de D-a.á.. Dakin fue uno de los primeros en demostrar que las proteínas que forman parte de la dieta presentan baja digestibilidad cuando se someten a las condiciones descritas anteriormente; otros estudios soportan dicha afirmación (132 ,133). Los procesos más comunes que pueden causar racemización son: la pasteurización, condensación, ultrapasteurización y fermentación (las bacterias constituyen una fuente

biológica de los D-isómeros) (128).

Los mamíferos poseen enzimas específicas para metabolizar a los D-a.á.. La vía metabólica principal se conoce como ruta de la D-aminoácidooxidasa, cuya secuencia de reacción se presenta en la figura 33:

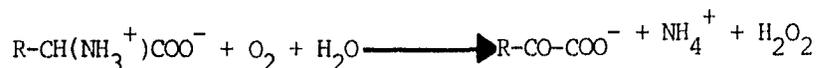


Fig. 33 Metabolismo de los D-a.á. por la ruta de la D-aminooxidasa.

Los α -cetoácidos sufren transaminación estereoespecífica y generan el L-isómero del a.á. original, el cual es entonces metabolizado por las vías catabólicas normales. La conversión de los D-a.á. en α -cetoácidos se lleva a cabo principalmente en el hígado y en el riñón de manera que los D-a.á. que se ingieren, deben difundirse primero a través de las membranas antes de que puedan metabolizarse por esta ruta.

Sin embargo algunos D-enantiómeros como el Asp, la Lys y la Thr, son sustratos pobres para la D-aminooxidasa, por lo que este sistema parece no haber sido desarrollado en respuesta a la racemización de los a.á., en virtud de que puede llegar a sobrecargarse y por ello se excretan los a.á. en la orina, aunque se considera que el papel de dichas enzimas es desintoxicar el organismo de los mamíferos, de los D-a.á. ingeridos en forma accidental.

IMPLICACION NUTRICIONAL:

Los péptidos que contienen residuos de D-a.á. son resistentes a la hidrólisis enzimática; por ello se detecta una disminución en la digestibilidad de las proteínas que se hace más evidente al aumentar el grado de racemización.

Los productos de la hidrólisis proteolítica de las proteínas que contienen a.á. racemizados son probablemente péptidos de bajo peso molecular, ricos en D-a.á. cuyo destino metabólico permanece aún sin conocerse, lo que se sabe es que no son buenos sustratos para la D-aminoácidooxidasa (134).

Acerca de los efectos adversos de los D-isómeros en la digestibilidad de las proteínas, se ha reportado que pueden deberse al hecho de que un residuo racémico de a.á., que por sí mismo no es sustrato para las proteasas, afecta la actividad de sus vecinos no racémicos y de esa forma ocasiona una pérdida significativa de a.á. esenciales conlindantes (128).

Es importante considerar, además, la posibilidad de que existan antagonismos entre los D-a.á. (D-Leu y D-Val por ejemplo) que inhiban la utilización de los mismos y aumenten con ello su grado de toxicidad.

Específicamente en el caso del hombre, los estudios realizados a cerca de la toxicidad de los D-a.á., no permiten aún concluir sobre las consecuencias de la racemización de las proteínas que forman parte de la dieta humana, ni de cómo afecten su digestibilidad y la disponibilidad de los a.á..

7.5 ANTAGONISMO DE AMINOACIDOS.

7.5.1 AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA:

En 1930 se efectuaron las primeras investigaciones a cerca de los efectos fisiológicos que se producen al combinar las dietas con a.á. de cadena ramificada; nos referimos a la Leu, Ile, y Val, que son los representantes de este grupo. tiempo después se reportó que disminuyen el crecimiento de ratas y pollos cuando se les ingiere en exceso (92). En este tipo de experimentos, los efectos en el crecimiento resultaban más significativos cuando la dieta suplementada con a.á. de cadena ramificada era deficiente en proteínas o en piridoxina, niacina o vitamina B₁₂. además dicho efecto podía revertirse después de un período de adaptación.

La disminución en el crecimiento causada por suplementos de Leu, puede superarse con éxito adicionando Ile a la dieta (135). En vista del parecido estructural que existe entre ambas moléculas se postuló la existencia de un antagonismo entre los dos compuestos por medio de la cual la Leu "obstaculiza la utilización normal de Ile".

Investigaciones subsecuentes señalan que los 3 a.á. de cadena ramificada, son mutuamente antagonistas, aunque no de forma equilateral. Así, los suplementos de Leu en dietas que contengan caseína en un 9%, generan disminución en el crecimiento, que puede corregirse casi en su totalidad por la adición de pequeñas cantidades de Ile y Val. Por otra parte, los suplementos de los dos compuestos anteriores (6%) ocasionan igualmente depresión en el crecimiento pero en menor grado respecto al observado con Leu. La conclusión propuesta para las relaciones existentes entre los tres a.á. indica que un suplemento excesivo de cualquiera de ellos, incrementa el requerimiento para los dos restantes.

El antagonismo observado puede operar de tres formas generales:

1. A través de los sistemas de transporte activo en los que participan grupos de compuestos similares, por lo tanto, es factible la competencia entre los miembros del grupo por dichos sitios. Tal competencia se da a nivel de absorción intestinal; por transferencia a través de membranas celulares o reabsorción de los túbulos renales.
2. Inhibiendo la incorporación de un a.á. en proteínas específicas cuando está presente un análogo estructural.
3. Alterando el catabolismo del a.á. de interés a causa del antagonista, posiblemente por competencia directa o afectando los mecanismos regulatorios.

Se ha verificado la competencia mutua entre a.á. de cadena ramificada por su paso a través del intestino. La administración de cierta dosis de un a.á. ramificado, indica que éste desaparece más lentamente en presencia de otro representante de dicho grupo.

El antagonismo existente entre Leu, Ileu y Val, permitió observar una manifestación bioquímica sorprendente: el cambio en la concentración plasmática de Ile y Val después de la administración de grandes dosis de Leu. La concentración de ambos a.á. en el plasma de ratas, disminuye después de tres horas que el animal consume alimento que contenga Leu en un 5% mientras que otros a.á. permanecen por lo general dentro del valor control. En el hombre, la disminución en la concentración de Ile y Val al administrar Leu, se ha comprobado de igual forma (136). La magnitud de esta depresión, varía con la dosis administrada. Otra investigación efectuada en ratas, y que consistió en administrarles Leu en exceso, proporcionó la siguiente información:

- a) Tres días después de iniciar el experimento, la concentración de Ile y Val en plasma resultó ser la mínima posible.
- b) El patrón de disminución en la concentración de a.á. de cadena ramificada a nivel muscular es similar al que se presenta en plasma.
- c) La concentración plasmática de otros a.á. puede mantenerse aún cuando en el músculo disminuya.

LEUCINA Y PELAGRA.

Se ha reportado un caso importante en el cual la leu. favorece ciertas alteraciones en el metabolismo del Trp y del ácido nicotínico. Este dato puede asociarse con la pelagra, enfermedad de mayor incidencia en poblaciones cuya base de alimentación difiere en cuanto a contenido de Leu, pero se mantiene constante en Trp y ácido nicotínico (137). Además, un exceso de Leu altera el patrón de excreción urinaria de los metabolitos del Trp, tanto en sujetos sanos como en los que padecen la enfermedad.

EFECTOS NEUROLOGICOS PRODUCIDOS POR AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA.

Las ratas alimentadas con dietas ricas en Val presentan niveles menores de 5-hidroxitriptamina (serotonina) cerebral comparadas con el control. Por su parte, la Leu produce un efecto similar. La explicación para este suceso se basa en el hecho de que estando presentes en exceso Leu e Ile, se inhibe el transporte del 5-hidroxitriptófano, compuesto precursor de la serotonina, a través de la barrera hematoencefálica. Por otra parte se ha comprobado cierta correlación entre un exceso de a.á. de cadena ramificada con deficiencias en el funcionamiento del sistema nervioso central (alteración del comportamiento) (92).

RESPUESTAS HORMONALES A UN EXCESO DE LEUCINA.

A partir de 1956 se introdujo y amplió clínica y experimentalmente, el

concepto de "hipoglicemia por Leu" La infusión intravenosa de una mezcla de aminoácidos provoca que se eleven rápidamente las concentraciones de aquellos, en plasma; ello proporciona el sustrato para que se lleve a cabo la gluconeogénesis hepática. Las células de los islotes del páncreas responden en un período de 5 min. liberando insulina. Esta liberación inducida por los a.á., es independiente de la producida por hiperglicemia.

Las respuestas adrenales de ratas alimentadas con dosis orales de Leu parecen oponerse a la acción insulinogénica de los a.á. debido a que mientras la insulina promueve la captación de a.á. al interior del músculo y su incorporación a proteínas, la corticosterona moviliza a dichos aminoácidos hacia el exterior del músculo.

7.5.2 ANTAGONISMO LISINA-ARGININA:

La Lys constituye un nutriente esencial para los mamíferos debido a que no es sintetizada por ellos. Este hecho permite que los efectos provocados por un exceso en su consumo, sean menores en comparación con los que produce la Met o el Trp. Se ha observado que conforme el nivel de Lys en la dieta rebasa la cantidad requerida para el crecimiento, ésta se acumula en el plasma de forma proporcional a su exceso.

Por otra parte, los mamíferos son capaces de sintetizar Arg vía ciclo de Krebs y ciclo de la urea, sin embargo dichas cantidades resultan insuficientes para permitir el crecimiento normal, siendo indispensable un suplemento del a.á. en la dieta.

La administración de un 4% de L-Arg a ratas alimentadas con dietas deficientes en proteínas, ocasiona una disminución en su crecimiento mientras que la misma concentración de Arg en dietas adecuadas, no provocan efectos adversos al animal (92). Diversas investigaciones permitieron concluir que aunque la tolerancia de ratas a la Arg es mucho mayor cuando el contenido --

proteínico de la dieta se incrementa, o si se mejora la calidad de una dieta deficiente en proteínas, el crecimiento de las ratas que consumen una cantidad adecuada de proteínas puede verse disminuído si el contenido de Arg se eleva considerablemente. Se han reportado los efectos producidos por un exceso de Arg en varios tejidos (138). Las distintas observaciones a nivel macroscópico, de microscopía de luz, microscopía electrónica, y análisis de sangre, permitieron concluir:

- 1.-La inyección de un exceso de Arg. produce importantes alteraciones de las células acinares del páncreas como son la pérdida de su característica basofilia, degeneración vascular y necrosis
- 2.-Se detecta vacuolización intracelular debida a lesiones de distensión que sufre el retículo endoplásmico liso o rugoso.
- 3.-Es posible encontrar disminución en los ribosomas y daños a nivel del retículo endoplásmico, lo que se traduce en efectos adversos en el RNA y en el metabolismo proteínico. Las anomalías morfológicas de la cromatina implican disminución en el metabolismo de las nucleoproteínas.
- 4.-Los hallazgos morfológicos encontrados en el páncreas son similares a alguno de los cambios observados después de la administración de Met o Phe por lo que la presencia de un desbalance por Arg puede relacionarse con el producido por otros a.á..

Otros investigadores han hallado alteraciones equivalentes a las descritas anteriormente además de indicar que los islotes de Langerhans permanecen intactos a un exceso de Arg. (139) La capacidad de la Arg para acelerar la conversión de amoníaco en urea proporciona cierta protección contra un exceso de a.á. que indirectamente ocasionan intoxicación por amoníaco. La ingestión de cantidades excesivas de Lys incrementan el requerimiento nutricional de Arg. De aquí la existencia de un antagonismo entre ambos aminoácidos. Además su manifestación se relaciona directamente con el tipo de proteína contenida en la dieta basal. Uno de los estudios más significativos sobre el antagonismo Lys-Arg se realizó con dos variantes genéticas de pollos, una que requiere elevadas cantidades de Arg, y otra con un bajo requerimiento de la misma. Ambas cepas son susceptibles al antagonismo Lys-Arg y su sensibilidad es proporcional al requerimiento de Arg en cada caso. A partir de los resultados obtenidos se concluyó lo siguiente:

- 1.-Distintos regímenes dietéticos indicaron que la cepa con un requerimiento

alto de Arg presenta una concentración de Lys considerablemente elevada en comparación con la otra cepa, por su parte la concentración plasmática de Arg permanece igual en ambos casos.

- 2.-Los efectos adversos en el crecimiento por un exceso de Lys en la dieta son más severos en la cepa que requiere de mayor cantidad de Arg.
- 3.-La diferencia en el requerimiento de Arg es exagerada cuando la proteína que conforma la dieta es rica en Lys, por ejemplo caseína.

MECANISMOS PARA EL ANTAGONISMO DE LISINA-ARGININA.

Partiendo del hecho que la Lys y la Arg son estructuralmente distintas y su metabolismo tiene poco en común, resulta importante conocer el mecanismo más viable a través del cual se produce el antagonismo descrito. Debe establecerse que el antagonismo no se produce a nivel de regulación del apetito sino que se manifiesta como una relación recíproca entre las concentraciones de cada compuesto en los tejidos. Jones reportó la elevación y depresión de Lys y Arg respectivamente, en el plasma como en músculo de pollos alimentados con dietas conteniendo Lys en un 2% (140). Se sabe que la Lys interfiere con la absorción de Arg en el intestino. La alimentación de pollos con dietas suplementadas en un 2% con Lys provoca que la excreción de Arg aumente de 3.2% a un 12.7%. El efecto descrito puede ser el causante de la pronta caída de los niveles plasmáticos de Arg después de ingerir alimento que contenga Lys en exceso. La degradación acelerada de Arg como resultado del aumento en la actividad enzimática que favorece su catabolismo (actividad inducida por la presencia de Lys) puede también ser el origen de la disminución en los pools de dicho a.á..

Capítulo VIII

Conclusiones

VIII. CONCLUSIONES

La presente investigación nos permite afirmar que no es posible permanecer con el concepto de que la importancia de los aminoácidos radica únicamente en ser componentes estructurales de las proteínas; fungen, como se mencionó en su oportunidad, como intermediarios metabólicos que conllevan a la síntesis de numerosos compuestos esenciales desde el punto de vista fisiológico. El hablar acerca de aminoácidos no es solamente referirnos a sus propiedades y fórmulas que permanecen en el tiempo y no cambian, sino profundizar y actualizar conocimientos sobre:

- a) Innovaciones en cuanto a técnicas de análisis cada vez mas sensibles, específicas, reproducibles, rápidas y sencillas.
- b) Avances respecto al papel que desempeña el metabolismo de los aminoácidos que al sufrir alteraciones de orden genético, desencadenan enfermedades conocidas como aminoacidopatías, acerca de las cuales el conocimiento de las mismas por parte del los profesionales de salud, no resulta suficiente y por ello no permite impedir los daños una vez que se han manifestado.
- c) Los efectos que produce un exceso en el consumo de aminoácidos y el objeto de agruparlos como toxicidad, desbalance y antagonismo.
- d) La importancia de que en nuestro país se difunda y apoye a las instituciones de salud pública para que cuenten con métodos sencillos y comunes, que manejados adecuadamente, puedan aplicarse en la detección oportuna de errores innatos del metabolismo de aminoácidos.

Capítulo IX

Bibliografías

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Voet, D.; Voet, J.G.; Biochemistry; John Wiley & Sons; U.S.A., 1990; P.p. 59-73.
2. Ondarza, R.N.; Biología Moderna; Ed. Trillas; México, 1991, P.p. 68 y ss, 217 y ss.
3. Lehninger, A.L.; Bioquímica; Las bases moleculares de la estructura y función celular 2da. ed.; Ediciones Omega, S.A.; Barcelona, España, 1979; P.p. 73 y ss.
4. Meister, A.; Biochemistry of amino acids, 2nd. Ed.; Academic Press; N. York, U.S.A., 1965; varias pp.
5. Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W.; Bioquímica de Harper; Ed. El Manual Moderno; México D.F., 1988; P.p. 12-22.
6. Fowden, L.; Lea, P.J. & Bell, E.A.; The non protein aminoacids of plants; Adv. Enzymol.; 1979; 50: 117-175.
7. Litter, M; Farmacología Experimental y Clínica 7a. ed.; Ed. El Ateneo; Argentina, 1986; P.p. 565 y ss.
8. Morrison & Boyd; Química Orgánica 5a. ed.; Ed. Adison-Wesley Iberoamericana; Wilmington Delaware, U.S.A., 1990; P.p. 1324 y ss.
9. Rawn, D.J.; Bioquímica Vol. I; Mc. Graw Hill; Madrid, España, 1989; P.p. 62-67.
10. Stahl, E.; Thin layer chromatography. A laboratory Handbook; Academic Press INC. Publishers; New York, U.S.A., 1965; P.p. 391-400.
11. Macherey-Nagel GmbH & Co.: Visualization reagents, in: TLC. Thin Layer Chromatography. Catalogue, 90el/11/0/12.89, Fed. Rep. of Germany, 1990, pp.96-101
12. Mallette, F.M., Clagett, C.O.; Phillips, A.T.; Mc. Carl, R.L.; Introductory Biochemistry; The Williams & Wilkins Co.; Maltimore, 1971; P.p. 388.
13. Lepri, L.; Desideri, P.G.; Coas, V.; Separation of dinitropyridyl amino acids by high pressure thin layer chromatography; J. Chrom.; 405: 394, 1987.
14. Günther, K.; Thin layer chromatography enantiomeric resolution via ligand exchange (Review); J. Chrom.; 448: 11-30, 1988.
15. Gringberg, N.; Weinstein, S.; Enantiomeric separation of DNS-amino acids by reversed phase thin layer chromatography; J. of Chrom.; 303: 251-255, 1984.
16. Hunkapiller, M.W.; Strickler, J.E.; Wilson, K.J.; Contemporary methodology for protein structure determination; Science; 226: 304-311, 1984.

17. Beckman Ins. Inc., System 6300; High performance amino acid analyzer; USA, 1989.
18. Jorgenson, J.W.; De Arman, L.K.; Capillary zone electrophoresis; Science; 222:266-272; 1983.
19. Gordon, M.J.; Huang, X.; Pentoney, S.L.; Capillary Electrophoresis; Science; 242: 224-228; 1988.
20. Mc Evoy-Bowe, E.; Cooling Plate for Cellulose Thin Layer Electrophoresis and its application to aminoacids analysis; J. of Chrom.; 347:199-208; 1985.
21. Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; et. al; High Performance Zone Electrophoresis; J. of Chrom.; 169:11-20; 1979.
22. Guttman, A.; Paulus, A.; Cohen, A.S.; et. al.; Use of complexin agents for selective separation in high performance capillary electrophoresis; J. of Chrom.; 488: 41-53; 1988.
23. Cruzado, I.D.; Vigh, G.; Chiral separations by capillary electrophoresis using cyclodextrin-containing gels; J. of Chrom.; 608: 421-425; 1992.
24. United States Pharmacopeia (USP 23); Chromatography & Physical Tests; U.S.A., 1993; P.p. 1774 ss.
25. Gamerith, G.; Derivatization of aminoacids to their N(O,S),-acil-alkil esters for gas-liquid chromatographic determination; J. of Crom.; 256: 326-330; 1983.
26. Gas Chromatography; Macherey-Nagel-Düren GmbH & Co.; Catalogue 1988/89; 1-49.
27. Gamerith, G.; Gas Chromatography of various N(O,S), Acil, Alkil, Esters of aminoacids; J. of Chrom.; 268: 403-415; 1983.
28. Abe, I.; Kuramoto, S.; Musha, S.; Chiral Phases derived from Xe-60 for glass capillary gas chromatography of aminoacid enantiomers; J. of Chrom.; 258: 35-42; 1983.
29. Köning, W.A.; Benecke, I.; Sievers, S.; New results in the gas chromatographic separation of enantiomers of hydroxiacids & carbohydrates; J. Chrom.; 217:71-73; 1981.
30. Hancock, W.S.; Harding, D.R.K.; Review of separation conditions. In: Handbook of HPLC for the separation of aminoacids, peptides & proteins. Vol I.; CRC Press, Inc.; Florida, U.S.A.; 1984; P.p. 235-249.
31. Neckers, L.M.; Delisi, L.E.; Jed, W.R.; Liquid-Chromatographic Quantification of Plasma Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan; Clinical Chemistry; 27(1):146-148; 1980.

32. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Getting started in: Introduction to modern Liquid Chromatography 2nd. ed.; Wiley- Interscience; 1979; P.p. 1-14.
33. Catálogo Waters (HPLC) *Cond. de prueba de un método HPLC para el análisis de aminoácidos* Series: *Compendio de métodos de análisis de aminoácidos*
34. Chromatography Solutions for Bioscience; Hewlett-Packard Co.; Publication Number: 12-5952-0622; France, 1990; P.p. 10, 17-18.
35. HP 1090 Win Liquid Chromatography System; Hewlett Packard Co.; Publication Number: 12-5091-4112E; Netherlands; 1992.
36. Roth, M.; Hampai, A.; Column Chromatography of aminoacids with fluorescence detection; J. of Chrom.; 83: 353-356; 1973.
37. Grego, B.; Hearn, M.T.W.; High-Performance Liquid Chromatography of aminoacids, peptides & proteins; J. of Chrom.; 255: 67-77; 1983.
38. Lam, S.; Stereoselective D- and L- aminoacid analysis by HPLC using mixed chelation with Cu (II); J. of Chrom.; 355: 157-164; 1986.
39. Brückner, H.; Strecker, B.; Use of chiral monohalo-s-triazine reagents for the liquied chromatographic resolution of DL-aminoacids; J. of Chrom.; 627: 97-105; 1992.
40. Boylestad, R.; Nashelsky, L.; Electrónica, Teoría de Circuitos 4a. ed.; Prentice-Hall; México, 1989; P.p. 11, 124-127.
41. Bylina, A.; Sybilska, D.; Grabowski, Z.R.; Koszewski, J.; Rapid-scanning spectrophotometry as a new detection system in chromatography; J. of Chrom.; 83: 357-362; 1973.
42. Carter, G.T.; et. al.; J. Pharm. Sci.; 71: 317-321; 1982.
43. Fell, A.F.; Clarck, B.J. & Scott, H.P.; Analysis & characterization of aromatic aminoacids metabolites & peptides by rapid-scanning photodiode array detection in HPLC; J. of Chrom.; 297: 203-214; 1984.
44. Fritz, J.S.; Schenk; G.H.; Química Analítica Cuantitativa, 3a. Ed.; Editorial Limusa; México, 1979; P.p. 445-466.
45. Stanbury, J.B.; Wyngaarden, J.B.; Fredrickson, D.S.; The Metabolic Basis of Inherited Disease; Mc. Graw Hill Book Company; U.S.A.; 1972, P.p. 223-476.
46. Cano, R.M.; Prueba Cromatográfica para la detección de aminoacidopatías en un tamiz neonatal, una técnica utilizando sangre total colectada en papel filtro; Tesis ULSA; México 1985; P.p. 6 ss.
47. Kelley, V.C.; Metabolic, Endocrine & Genetic Disorders of Children Vol. I; Harper & Row Publishers Inc.; Maryland, 1974.
48. Seashore, M.R.; Rinaldo, P.; Metabolic disease of the neonate and young infant; Semin. Perinatol.; U.S.A., 1993; 17(5):318-329.

49. Wien, K. ; Selective Screening for amino and organid acid inborn errors; *Wochenschr, Austria*, 1992; 104(21):651-657.
50. Wu, J.T.; Screening for inborn errors of aminoacid metabolism; *Ann. Clin. Lab. Sci.*; U.S.A., 1991; 21(2):123-142.
51. Thomas, E.; Dietary management of inborn errors of aminoacid metabolism with protein modified diets; *J. Child. Neurol.*; U.S.A., 1992; 7 suppl.:592-611.
52. Ozand, P.T.; Gascon G.G.; Organic Acidurias: A review, Part 2.; *J.Child. Neurol.*; U.S.A., 1991; 6(4):288-303.
53. Sovi, k.O.; Inborn errors of aninoacid and fatty acid metabolism with hypoglucemia as a major clinical manifestation; *Acta. Pediatr. Scand.*; Sweden, 1989; 78(2):161-170.
54. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D.; *The metabolic & Molecular bases of Inherited Disease Vol. I*, 7th. ed.; Mc. Graw Hill; U.S.A., 1995; P.p. 1030-1337.
55. Menhert, H.; Föster, H.; *Enfermedades del Metabolismo*; Salvat Editores; España, 1977; 412 y ss.
56. Goldberg, P.; Romano, V.; Ceratto, N.; Bosco, P.; Ciuna, M.; Indelicato, A.; Mollica, F.; Meli, C.; Giovannini, M.; Riva, E.; et. al.; Mutational spectrum of pheylalanine hidroxyylase deficiency in Sicily: Implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe; *Hum. Mol. Genet.*; England, 1993; 2(10):1703-1707.
57. Avigad, S.; Kleiman, S.; Weinstein, m.; Cohen, B.E.; Schwartz, G.; Woo, S.L.; Shllon, Y.; Compound Heterozygosity in nonphenilketonuria hyperphenylalaninemia: the contribution of mutations for classical pheylketonuria; *Am. J. Hum. Genet.*; U.S.A., 1991; 49(2):393-399.
58. Vela, M.; *Comunicación Verbal*; Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría; México, 1996.
59. Cuticchia, A.J.; Pearson, P.L.; *Human Gene 1993 Mapping (A Compendium)*; The Johns Hopkins University Press; Baltimore & London-U.S.A. 1994; pp. 758 S.s..
60. Krupp, M.A.; Chatton, M.J; *Diagnóstico Clínico y Tratamiento*; Ed. E Manual Moderno; México, 1982; P.p. 1139-1160.
61. *Directorio del Internet*; Programa de Internet para Enfermedades Metabólicas, red con Latinoamérica; INP-Unidad de Genética de la Nutrición.

62. Parsons H.G.; Carter, R.J.; Unrath, M; Snyder, F.F.; Evaluation of branch-chain aminoacid intake in children with maple syrup urine disease and methylmalonic aciduria; *J. Inherit. Metab. Dis.*; Netherlands, 1990; 13(2):125-136.
63. Mogos, T.; Cheta, C.P.; Minco, I.T.; Clinical consequences of disorders in the intermediate metabolism of branch chain aminoacids (valine, leucine & isoleucine); *Rom. J. Intern. Med.*; Romania, 1994; 32(1):57-61.
64. Cicerón, A. I.; Investigación prospectiva de una población de pacientes mexicanos con Errores Innatos del Metabolismo atendidos en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría, para definir sus necesidades de atención integral de enfermería; Tesis UNAM; México, 1994; P.p. 19-25.
65. Demers, S.I.; Phaneut, D.; Tanguay, R.M.; Hereditary tyrosinemia type I: strong association with haplotype 6 in French Canadians permits simple carrier detection and prenatal diagnosis; *Am J. Hum. Genet.*; U.S.A., 1994; 55(2):327-333.
66. Natt, E.; Kida, K.; Odievre, M.; Di RoccoM.; Scherver, G.; Point Mutations in the tyrosine aminotransferase gene in tyrosinemia type II; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; U.S.A., 1992; 89(19):9297-9301.
67. Phaneuf, D.; Lambert, M.; Laframboise, R.; Mitchell, G.; Lettre, F.; Tanguay, R.M.; Type I hereditary tyrosinemia. Evidence for molecular heterogeneity and identification of a causal mutation in French-Canadian patient; *J. Clin. Invest.*; U.S.A., 1992; 90(4):1185-1192.
68. Bachmann, C.; Ornithine Carbamoyl Transferase deficiency: findings, models and problems; *J. Inherit. Metab. Dis.*; Netherlands, 1992; 15(4):578-591.
69. Chitayat, D.; Balbut, A.; Hani, V.; Mamer, O.A.; Clow, C.; Scriver, C.R.; Hereditary tyrosinaemia type II in a consanguineous Ashkenazi Jewish family: intrafamilial variation in phenotype; absence of parental phenotype effects on the fetus; *J. Inherit. Metab. Dis.*; Netherlands, 1992; 15(2):192-203.
70. Maestri, N.E.; Mc. Gowan, K.D.; Brusilow, S.W.; Plasma glutamine concentration: a guide in the management of urea cycle disorders; *J. Pediatr.*; U.S.A., 1992; 121(2):259-261.
71. Kure, S.; Takayanag, M.; Narisawa, K.; Tada, K.; Leisti, J.; Identification of common mutation in Finnish patients with nonketotic hyperglycinemia; *J. Clin. Invest.*; U.S.A., 1992; 90(1):160-164.

72. Francis, D.E.; Kirby, D.M.; Thompson, G.N.; Maternal tyrosinaemia II: management and succesful outcome; Eur. J. Pediatr.; Germany, 1992; 15(3):196-199.
73. Rootwelt, H.; Kvittingen, E.A.; Hoie, K.; Agsteribbe, E.; Hartog, M.; Van Faassen, H.; Berger, R.; The human fumarylacetoacetase gene: characterization of restriction fragment length polymorphysms and identification of haplotypes in tyr type I and pseudodeficiency; Hum. Genet.; Germany, 1992; 89(2):229-233.
74. Haraguchi, Y.; Uchino, T.; Takiguchi, M.; Endo, F.; Mory, M.; Matsuda, I.; Cloning and sequence of a cDNA encoding human carbamyl phosphate synthetase I: molecular analysus of hyperammonemia; Gen.; Netherlands, 1991; 107(2):335-340.
75. Ko, F.J.; Nynan, W.L.; Wolff, J.; Barshop, B; Suetman, L.; 3-Hidroxyisobutiric aciduria: an inborn error of valine metabolism; Pediatr. Res.; U.S.A., 1991; 30(4):322-326.
76. Shimizu, H.; Maekawa, K.; Eto, Y.; Abnormal urinary excretion of poliamines in HHH sindrome (hyperornitinemia associated with hyperammonemia and homocitrullinuria; Brain Dev.; Japan, 1990; 12(5):533-535.
77. De Braekleer, M.; Larochele, J.; Genetic epidemiology of hereditary tyrosinemia in Quebec and in Seguenaa-Lac.-St.-Jean; Am. J. Hum. Genet.; U.S.A., 1990; 47(2):302-307.
78. Sassa, S.; Fujita, H.; Kappas, A.; Succinylacetone and delta-aminolevulinic acid dehydratase in hereditary tyrosinemia: immunochemical study of the enzyme; Pediatrics; U.S.A., 1990; 86(1):84-86.
79. Diario Oficial de la Federación; Tomo CDLXXXI No. 17; México D.F.; Sábado 23 de Oct.; 1993.
80. Mogos, T.; Popescu, C.; Dumitrescu, A.; Tanase, I.; Mincu, I.; The relationship between aminoaciduria and plasma hemoglobin levels; Rom. J. Intern. Med.; Romania, 1993; 31(3):223-228.
81. SSA; Subsecretaría de Servicios de Salud; Dirección de educación para la Salud; Unidad de Genética de la Nutrición UNAM; Prevención del Retraso Mental: Manual para médicos y enfermeras; México, 1987; P.p. 2-9.
82. Hoffman, W.S.; The biochemistry of Clinical Medicine; Year Boock Medical Publishers, Inc.; U.S.A., 1964; P.p. 27-37.
83. Velázquez, A.; Experiencias en la prevención y tratamiento de Errores Innatos del Metabolismo; En: Martucelli, J.; Palacios de la Lama, R. & Soberón Acevedo Eds. de Publicaciones de la UNAM; México, 1984; P.p. 263-283.

84. Durana-Zaleski, I.; Saudobray, J.M.; Kamoun, P.P.; Blum-Boisgard, C.; Inborn errors of aminoacid metabolism. The best strategy for their diagnosis; *Int. J. Technol. Assess Health Care*; England, 1992; 8(3):471-478.
85. Qu, Y.; Miller, J.B.; Slocum, R.H.; Shapira, E.; Rapid automated quantitation of isoleucine, leucine, tyrosine and phenylalanine from blood filter paper specimens; *Clin. Chim. Acta.*; Netherlands, 1991; 203:(2-3):191-197.
86. Haynes, P.A.; Sheumack, D.; Greig, L.G.; Kibby, J.; Redmond, J.W.; Applications of automated aminoacid analysis using 9-fluorenylmethyl chloroformate; *J. Chromatogr.*; Netherlands, 1991; 588(1-2):107-114.
87. Velázquez, A.; El estudio de los Errores Innatos del Metabolismo y sus implicaciones para la Medicina; Academia Nacional de Medicina; México, 1980; 110:17.
88. Velázquez, A.; Lowenberg, M.; Pommier-Gómez, N.; del Vecchio, N.; Carnavala, A.; Niño de Rivera, A.; Castillo, V.; Diagnóstico Prenatal de Enfermedades Genéticas; *Ginec. Obstet.*; México, 1978; 44:395.
89. Volmer, D.W.; Jinks, D.C.; Guthrie, R.; Isocratic reverse-Phase liquid chromatography assay for aminoacid metabolic disorders using eluates of dried blood spots; *Anal. Biochem.*; U.S.A., 1990; 189(1):115-121.
90. Zieve, L.; Aminoacids in liver failure.; *Gastroenterology*; 76(1): 219-221; 1979.
91. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S. & Valle, D.; *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.*; Vol. I.; Mc. Graw Hill; U.S.A.; 1995.
92. Harper, A.E.; Benevenga, N.J.; Nohlheuter, R.M.; Effects of Ingestion of disproportionate amounts of aminoacids.; *Physiol. Rev.*; 50: 428-558; 1970.
93. Goodhart, S.R.; *Nutrición en la Salud y la Enfermedad*; Salvat Editores; Barcelona, España; 1987; P.p. 50 s.s..
94. Rusell, W.C.; Taylor, M.W., Hogan, J.M.; Effect of excess essential aminoacids on growth of the white rat.; *Arch. Biochem. Biophys.*; 39: 249-253; 1952.
95. Christensen, H.N.; Aminoacid transport and nutrition.; *Federation Proc.*; 22: 110-114; 1963.
96. Benevenga, N.J.; Steele, R.D.; Adverse effects of excessive consumption of aminoacids; *Annu. Rev. Nutr.*; 4: 157-181; 1984.
97. Man, E.H.; Bada, J.L.; Dietary D-Aminoacids; *Annu. Rev. Nutr.*; 7: 209-225; 1987.

98. Phear, E.A.; Ruebner, B.; et al.; Methionine toxicity in liver disease and its prevention by chlortetracycline; *Clin. Sci.*; 15: 93-117; 1956.
99. Pollin, W.; Cardon, P.V. Jr.; Kety, S.S.; Effects of amino acid feedings in schizophrenic patients treated with ipronizid; *Science*; 133: 104-105; 1961.
- 100a. Rose, W.C.; The nutritive significance of the amino acids and certain related compounds; *Science*; 86:298-300; 1937.
- 100b. Rama Rao, P.B.; Metta, V.C.; Norton, H.W.; Johnson, B.C.; The amino acid composition and nutritive value of proteins III. The total protein and the non-essential amino nitrogen requirement; *Journal of Nutr.*; 71:361-365; 1960.
101. Hier, S.W.; Influence of ingestion of single amino acids on the blood level of free amino acids; *J. Biol. Chem.*; 171: 813-820; 1947.
102. Green, H.; Greenberg, S.M.; Erickson, R.W.; Sawyer, J.L.; Ellison, T.; Effect of dietary phenylalanine and tryptophan upon rat brain amine levels; *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*; 136: 174-178; 1962.
103. McKean, C.M.; Boggs, D.E., Peterson, N.A.; The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentration of essential amino acids in brain; *J. Neurochem.*; 15: 235-241; 1968.
104. Hughes, J.V.; Johnson, T.C.; The effects of phenylalanine on amino acid metabolism and protein synthesis in brain cells in vitro; *J. Neurochem.*; 26: 1105-1113; 1976.
105. Binek-Singer, P.; Johnson, T.C.; The effects of chronic hyperphenylalaninaemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by other amino acids; *Biochem. J.*; 206: 407-414; 1982.
106. Goldsmith, L.A.; Tyrosine-induced skin disease; *Br. J. Dermatol.*; 98: 119-121; 1978.
107. Goldsmith, L.A.; Reed, J.; Tyrosine-induced eye and skin lesions: a treatable genetic disease; *J. Am. Med. Assoc.*; 236: 382-384; 1976.
108. Selye, H.; Steroids influencing the toxicity of L-tyrosine; *J. Nutr.*; 101: 515-524; 1971.
109. Rodwell, V.W.; Murray, R.K.; Gramer, D.K.; Mayes, P.A.; *Bioquímica de Harper*; El manual moderno; México D.F.; 1988; pp. 278-302.
110. Pinsky, J., Geiger, E.; Intestinal absorption of histidine as influenced by tryptophan in the rat; *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*; 81: 55-57, 1952.
111. Hodge, J.V.; Oates, J.A.; Sjoerdsma, A.; Reduction of the central effects of tryptophan by a decarboxylase inhibitor; *Clin. Pharmacol. Therap.*; 5: 149-155; 1964.

112. Lapin, I.P.; Kynurenines and seizures; *Epilepsia*; 22: 257-265; 1981.
113. Gal, E.M.; Sherman, A.D.; L-Kynurenine, its synthesis and possible regulatory function in brain; *Neurochem. Res.*; 5: 223-239; 1980.
114. Sauberlich, H.F.; Studies on the toxicity and antagonism of aminoacids for weanling rats; *J.Nutr.*; 75: 61-72; 1961.
115. Russel, W.C.; Taylor, M.W.; Hogan, J.M.; Effect of excess essential aminoacids on growth of the white rat; *Arc. Biochem. Biophys.*; 39: 249-253; 1952.
116. Perry, T.L.; Hardwick, D.F.; Dixon, CH.; Dolman, C.L.; Hansen, S.; Hypermethioninaemia: cirrhosis, islet hyperplasia, tubular degeneration; *Pediatrics*; 36: 236-250; 1965.
117. Peng, Y.S.; Russell, DH.; Evenson, J.K.; Alleviation of methionine toxicity by glycine and serine in rats pretreated with excess retinol; *Nutr. Rept. Int.*; 23: 303-311; 1981.
118. Peng, Y.S.; Everson, J.K.; Alleviation of methionine toxicity in young male rats fed high levels of retinol; *J. Nutr.*; 109: 281-290; 1979.
119. Munro, H.N.; Steele, M.H.; Hutchison, W.C.; Blood corticosterone levels in the rat after administration of aminoacids; *Nature.*; 199: 1182-1183; 1963.
120. Case, G.L.; Mitchell, A.D.; Harper, A.E.; Benevenga, N.J.; Significance of choline synthesis in the oxidation of the methionine methyl group in rats; *J. Nutr.*; 106: 735-746; 1976.
121. Steele, R.D.; Benevenga, N.J.; The metabolism of 3-methylthiopropionate in rat liver homogenates; *J. Biol. Chem.*; 254: 8885-8890; 1979.
122. Benevenga, N.J.; Evidence for alternative pathways of methionine catabolism; *Adv. Nutr. Res.*; 6: In Press; 1984.
123. Fell, D.; Steele, R.D.; Enhancement of histidine and one-carbon metabolism in rats fed high levels of retinol; *J.Nutr.*; 112: 474-79; 1982.
124. Eichelman, B.; Solomon, J.K.; Qureshi, A.A.; L- histidine-induced suppression of lipogenic enzymes; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 82: 1034-1039; 1978.
125. Pagé, E.; Gingras, R.; Glycine toxicity and pyridoxine requirements in the white rat; *Trans. Ro. Soc. Can. Sect.*; 40: 119-122; 1946.
126. Hardy, R.W.; Tantengco, V.P.; Baumann, C.A.; Effects of aminoacids on the excretion of various proteins by the rat; *J. Nutr.*; 70: 438-446; 1960.
127. Artom, C.; Fishman, W.H.; Morehead, R.P.; The relative toxicity of l- and dl-serine in rats; *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*; 60: 284-87; 1945.

128. Man, E.H.; Fisher, G.H.; payan, I.L.; Cadilla-Perezrios, R.; García, N.M.; et. al.; D-Aaspartate in human brain; *J. Neurochem.*; 48: 510-515; 1987.
129. Bada, J.L.; In vivo racemization in mammalian proteins; *Methods Enzymol.*; 106: 98-115; 1984.
130. Neuberger, A.; The metabolism of D-aminoacids in mammals; *Biochem. Soc. Symp.*; 1: 20-32; 1948.
131. Bunjapamai, S.; Mahoney, R.R.; Fagerson, I.S.; Determination of D-aminoacids in some processed foods and effect of racemization on in vivo digestibility of casein; *J. Food. Sci.*; 47: 1229-1234; 1982.
132. Friedman, M.; Zahnley, J.C.; Masters, P.M; Relationship between in vitro digestibility of casein and its content of lysinoalanine and D-aminoacids; *J. Food. Sci.*; 46: 127-134; 1981.
133. Burton, K.; D- aminoacid oxidase from kidney; *Methods Enzymol.*; 2: 199-204; 1955.
134. Harper, A.E.; Benton, D.A.; Winje, m.E.; Elvehjem, C.A.; Leucine antagonism in the rat; *Arch. Biochem. Biophys.*; 51: 523-524; 1954.
135. Swendseid, M.E.; Villalobos, J.; Figueroa, W.S.; Drenick, E.J.; The effects of test doses of leucine, isoleucine or valine in plasma aminoacid levels. The unique effect of leucine; *Am. J. Clin. Nutr.*; 17: 317-321; 1965.
136. Gopalan, C.; Leucine and pellagra; *Nutr. Rev.*; 25: 323-326; 1968.
137. Mizunuma, T.; Kawamura, S.; Kishino, Y.; Effects of injecting excess arginine on rat pancreas; *J. Nutr.*; 114: 467-471; 1984.
138. Kishino, Y.; Kawamura, S. Pancreatic damage induced by injecting a large dose of arginine; *Virchows. Arch.*; 47: 147-155; 1984.
139. Jones, J.D.; Lysine-arginine antagonism in the chick; *j. Nutr.*; 84: 313-321; 1964.
140. Jones, J.D.; Petersburg, S.J.; Burnett, D.C.; The mechanism of lysine-arginine antagonism in the chick: effect of lysine on digestion kidney arginase and liver transamidinase; *J. Nutr.*; 93: 103-116; 1967.