



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS POR
HPLC EN INDIVIDUOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

EDITH VELASCO OSORIO



México D. F.

2011



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.



Jurado Asignado

Presidente: Dra. Yolanda Caballero Arroyo
Vocal: M en A. Rosa Luz Cornejo Rojas
Secretario: Dra. Rosalinda Guevara Guzmán
1er. suplente: M en C. Francisco Rojo Callejas
2do. suplente: Ehecatl Luis David Paleo González

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 414. Edificio A
Facultad de Medicina UNAM

Asesor

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

Sustentante

Edith Velasco Osorio





Agradecimientos

A la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán por todo su apoyo en la realización de este trabajo.

Al jurado asignado: Dra. Yolanda Caballero Arroyo, a la M en A. Rosa Luz Cornejo Rojas, a la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, al M en C. Francisco Rojo Callejas, al Prof. Ehecatl Luis David Paleo González, por sus aportaciones y tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Jorge Guevara Fonseca y al M. en C. Alfonso Daniel Díaz Fonseca del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por su participación en la determinación de Nitritos.

A la Q. Adriana Mayoral Mariles y a la Q.A. María Elena Jiménez Hernández por su ayuda en el área analítica y en el análisis estadístico de este proyecto.

A la Dra. Gabriela Madrigal y al Biol. Ricardo Mota del Centro de Salud José Castro Villagrana por toda la ayuda y facilidad brindada en la recolección de las muestras sanguíneas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química por todos los conocimientos brindados.





Dedicatoria

A mis padres

Agradezco por todo su apoyo y comprensión durante todo este tiempo.

A mis hermanos

Gracias por su compañía y apoyo.

A mis amigos

Erika, Edgar, Alejandra, Ofelia, Leslie, Noe, Veronica, Alicia, Ana Angelina, Elva, Aura, Jeanete, Jazmín, Ana Silvia y Berenice. Por todos los momentos compartidos.

Arigato.





Tabla de contenido

Jurado Asignado.....	ii
I INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. JUSTIFICACIÓN	8
1.2. OBJETIVO GENERAL.....	9
1.3. OBJETIVO PARTICULAR	9
II MARCO TEÓRICO.....	10
2.1. CARBOHIDRATOS	10
2.1.1. DEFINICIÓN	10
2.1.2. CLASIFICACIÓN	10
2.1.3. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA.....	11
2.1.4. METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS.....	16
2.1.5. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.....	17
2.2. DIABETES MELLITUS	19
2.2.1. DEFINICIÓN	19
2.2.1. CLASIFICACIÓN	19
2.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2	21
2.3.1. DEFINICIÓN	21
2.3.2. SINTOMAS.....	21
2.3.3. FACTORES DE RIESGO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2	22
2.3.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2	23
2.3.5. COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS	25
2.3.6. MECANISMOS DE LAS COMPLICACIONES	27
2.4. INSULINA.....	29
2.4.1. DEFINICIÓN	29
2.4.2. SECRECIÓN DE INSULINA	29
2.4.3. ACCIÓN DE LA INSULINA	31
2.4.4. RECEPTOR DE INSULINA.....	33
2.5. AMINOÁCIDOS	35
2.5.1. DEFINICIÓN	35





2.5.2. CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS	36
2.5.3. IMPORTANCIA DE LOS AMINOÁCIDOS	38
2.5.4. AMINOÁCIDOS Y SECRECIÓN DE INSULINA	39
III METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	42
3.1. CROMATOGRAFÍA	42
3.1.1. FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA.....	42
3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA O HPLC.....	42
3.2.1. APLICACIONES DE HPLC	43
3.2.2. INSTRUMENTACIÓN	45
3.3. CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS.....	49
3.3.1. DISOLUCIONES	49
3.3.2. CURVA DE CALIBRACIÓN.....	50
3.3.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	52
3.4. CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS	53
IV RESULTADOS.....	54
4.1. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS.....	54
4.1.1. POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	56
4.1.2. GÉNERO MASCULINO.....	58
4.1.3. GÉNERO FEMENINO	61
4.1.4. GÉNERO FEMENINO VS GÉNERO MASCULINO	64
4.2. CONCENTRACIÓN DE NITRITOS	67
V DISCUSIÓN	69
VI CONCLUSIONES.....	79
APÉNDICE	81
VII BIBLIOGRAFÍA	97





I INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM), es una enfermedad crónico - degenerativa, incurable, pero controlable, que afecta al 15% de la población mundial. De esta proporción de la población, a la Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1), le corresponde el 10%, mientras que a la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), el 85%.¹

La DM1 aparece en individuos que presentan un defecto en la secreción de insulina, por lo que requieren un tratamiento a base de insulina exógena. Suele presentarse en personas jóvenes no obesas. Además de glucosuria, polidipsia y poliuria, estos individuos presentan una notable pérdida de masa corporal, también es frecuente la presencia de elevadas concentraciones de compuestos cetónicos en sangre y orina.

A diferencia de la DM1, la DM2 se presenta frecuentemente en adultos obesos, otra característica es que en la DM2 no hay ausencia de insulina; el problema primario es la resistencia a la acción de la insulina.² En este tipo de diabetes no se produce cetoacidosis, debido a que los adipocitos permanecen sensibles al ^{efecto} de la insulina sobre la lipólisis (proceso metabólico en el que los lípidos son transformados para producir ácidos grasos y glicerol).^{2,3}

En México, la diabetes mellitus está considerada como la primera causa de muerte debido a complicaciones, como cardiopatías, enfermedades cerebro-vasculares e insuficiencia renal. Además es la causa más importante de amputación de miembros inferiores de origen no traumático, así como de la causa principal de ceguera.¹

Estudios también han revelado que pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 tienen un mayor riesgo de presentar daño en el sistema nervioso provocando trastornos de la memoria, los cuales pueden culminar en el desarrollo de algún tipo de Demencia, particularmente de Alzheimer, esto es posiblemente debido a una disminución de la actividad de la insulina en el cerebro.⁴



Se sabe que aminoácidos específicos como; alanina, arginina, leucina e isoleucina, regulan la secreción de insulina por células β pancreáticas, esto se logra con ayuda de la actividad mitocondrial, debido a que participa en el acoplamiento de los aminoácidos y el reconocimiento de la glucosa para que se lleve a cabo la exocitosis de los gránulos de insulina.

La mitocondria genera ATP, el cual es el principal mensajero de enganche en la secreción de insulina. Por lo tanto los aminoácidos pueden jugar un papel importante en la secreción de insulina de forma directa o indirecta (a través de la generación de mensajeros de origen mitocondrial).

En general los aminoácidos pueden influir en la secreción de insulina a través de una variedad de mecanismos, incluida la generación de factores metabólicos de acoplamiento, despolarización de la membrana, o una mejora de la función mitocondrial.⁵

1.1. JUSTIFICACIÓN

En México, la diabetes mellitus está considerada como la primera causa de muerte debido a complicaciones. Entre el 2001 y 2005 la tasa de mortalidad por este padecimiento fue del 89.9% en mujeres y del 86.1% en hombres, debido a esto es considerada como una enfermedad de salud pública.

Algunos autores reportan⁵ que el metabolismo de aminoácidos es esencial para una función normal de las células β pancreáticas, particularmente el de la alanina y glutamina pero aun no se determina claramente cómo es que el metabolismo de estos aminoácidos puede ayudar al correcto funcionamiento de las células β pancreáticas, en México no existe ningún trabajo en el que se evalúen los niveles de aminoácidos plasmáticos en personas con Diabetes mellitus tipo 2.





1.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la concentración de 18 aminoácidos en plasma sanguíneo en una población mexicana con Diabetes Mellitus tipo 2 y en individuos sanos (grupo control) mediante la utilización de un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC.

1.3. OBJETIVO PARTICULAR

Determinar si los niveles de aminoácidos plasmáticos son significativamente diferentes entre un individuo diabético y un individuo sano.

Determinar la concentración de nitritos (NO_2^-) en plasma sanguíneo como indicador de estrés oxidativo.





II MARCO TEÓRICO

2.1. CARBOHIDRATOS

2.1.1. DEFINICIÓN

Las principales clases de compuestos orgánicos, comunes en los sistemas vivos, son lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Son la forma biológica primaria de almacenamiento y consumo de energía, a muchos de ellos se les conoce como “azúcares”.⁶

Anteriormente, a los carbohidratos también se les llamaba hidratos de carbono. Porque están compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno, teniendo en muchos casos (aunque no en todos) como fórmula general $C_n(H_2O)_n$. Sin embargo es más conveniente definir a un carbohidrato como un polihidroxialdehído, o una polihidroxicetona, porque esta definición está más próxima a su realidad estructural, y hace referencia a su reactividad química.^{6,7}

2.1.2. CLASIFICACIÓN

De acuerdo a la cantidad de moléculas que intervienen en su formación encontramos diferentes tipos de carbohidratos, los monosacáridos, los disacáridos, y los polisacáridos.

Los monosacáridos o carbohidratos simples, son carbohidratos que al ser hidrolizados no se rompen en carbohidratos menores. El monosacárido más abundante e importante es la glucosa, el cual es el combustible principal para la mayoría de los organismos.^{3,7}



Un disacárido se rompe por hidrólisis, y forma dos monosacáridos que pueden ser iguales o diferentes. La sacarosa, el azúcar común, es un disacárido que, por hidrólisis forma una molécula de glucosa y una de fructosa.

Los monosacáridos se clasifican en aldosas o cetosas. El sufijo –osa designa al carbohidrato; los prefijos aldo- y ceto- identifican la naturaleza del grupo carbonilo.

2.1.3. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA

La glucosa es un combustible clave para los mamíferos. Se obtiene principalmente de la dieta y de la síntesis a partir de otros sustratos en órganos como el hígado. La glucosa derivada de la dieta es transferida desde la luz del intestino delgado, hasta el torrente sanguíneo, la glucosa sintetizada en el cuerpo tiene que ser transportada desde el torrente sanguíneo hasta las células blanco. Estos procesos implican la transferencia de la glucosa a través de las membranas plasmáticas. Sin embargo, las membranas de dichas células son impermeables a moléculas hidrofílicas como la glucosa. Para permitir la entrada y salida de glucosa los órganos y tejidos poseen en las membranas plasmáticas transportadores (Tabla 1) que son capaces de llevar a la glucosa al interior de la célula.⁸

Se han descrito en la literatura 2 tipos de transportadores de glucosa:

1. Co-transportadores de Na^+ /Glucosa (SGLT).
2. Los que transportan glucosa a través del mecanismo de difusión por gradiente (GLUT).





2.1.3.1. SGLT (Co-transportadores Sodio/Glucosa)

Estos sistemas de co-transporte de glucosa acoplados a Sodio (Na^+) se encuentran en el epitelio intestinal, en el epitelio de los túbulo contorneados proximal y distal del riñón, permitiendo la rápida absorción del sodio, además de la reabsorción de la glucosa filtrada en el glomérulo nuevamente al torrente sanguíneo.

Este tipo de transporte se realiza a través de un mecanismo de transporte activo secundario. Aprovechan el transporte del Na^+ a favor de un gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica que produce cambios conformacionales necesarios para la translocación de la glucosa a través de la membrana plasmática.^{9,10}

La bomba de Na^+/K^+ situada en la membrana celular mantiene el gradiente electroquímico de Na^+ entre la luz intestinal y la célula epitelial, con lo que, 3 iones Na^+ se intercambian con 2 iones de K^+ , manteniendo un circuito de circulación de sodio que impulsa la absorción eficiente de la glucosa.^{9, 10} El proceso por el cual se lleva a cabo este transporte se observa en la Figura 1.

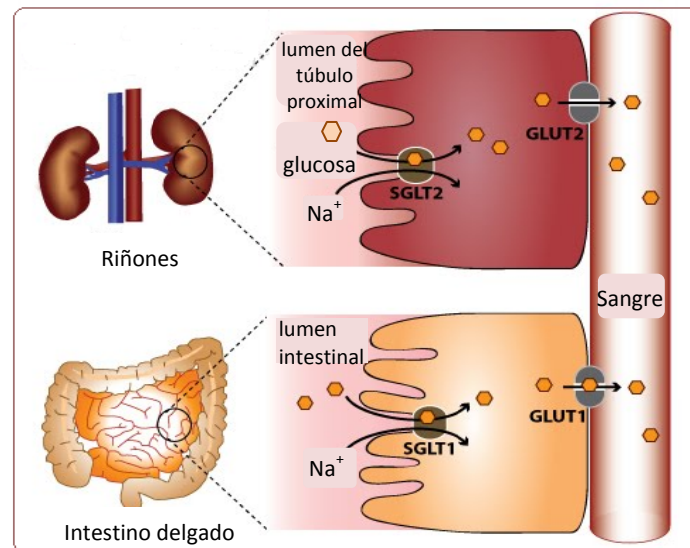


Figura 1. Mecanismo de transporte SGLT. Primer paso es la unión de dos iones Na^+ al cotransportador, produciendo cambios conformacionales en el SGLT que permite la unión de una molécula de glucosa. Una reorganización estructural transporta al Na^+ y a la glucosa a la cara exterior citosólica del transportador liberando una molécula de glucosa y de iones sodio al citosol.





Se conocen 6 isoformas (SGLT1-6). En el ser humano el transportador SGLT-1 se expresa primariamente a nivel del íleon, el sitio fundamental de absorción de monosacáridos como la glucosa, galactosa, manosa y fructosa. Este transportador es específico para la absorción de glucosa y galactosa en las células epiteliales del ribete en cepillo del intestino delgado.

2.1.3.2. GLUT (Transportadores de glucosa)

Los transportadores GLUT son una familia de proteínas integrales de membrana, constituidas por una cadena polipeptídica de aproximadamente 500 aminoácidos, con 12 segmentos transmembranales que forman el canal por donde ingresa la glucosa a la célula (Tabla 1).

Transportan glucosa siguiendo un gradiente de concentración (de un gradiente alto a un gradiente bajo), proceso descrito como difusión facilitada. La energía para el transporte de glucosa proviene de eliminar la diferencia de concentración de la glucosa. Estos transportadores permiten que la glucosa entre con facilidad a las células, pero también pueden permitir su salida de las células según la diferencia de concentración.^{9,1}

GLUT-1 y GLUT-4 se han identificado en la membrana del musculo esquelético; GLUT-1 está involucrado principalmente en la captación de glucosa basal, mientras que GLUT-4 es un importante transportador de glucosa que responde a la acción de insulina y se expresa en mayor parte en músculo esquelético, cardiaco y tejido adiposo.





El transportador GLUT-4 es el principal transportador de la glucosa; se localiza preferentemente en el músculo y en los adipocitos. La insulina se une a la porción extracelular del receptor, desencadenando la traslocación de GLUT-4 a la membrana plasmática, proceso mediado por un sistema de cinasas activadas y por proteínas que regulan la partición de vesículas que contienen al transportador proteico.⁹

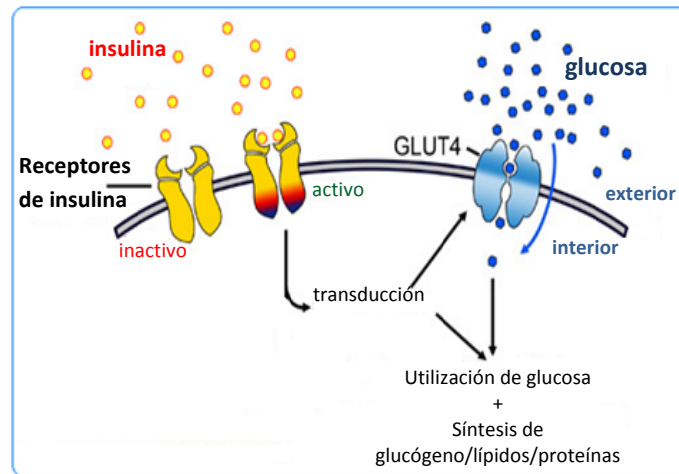


Figura 2. Mecanismo de Transporte de GLUT-4. La insulina se une a su receptor, desencadenando la traslocación de GLUT-4 a la membrana plasmática para el transporte de glucosa.





Tabla 1. Transportadores de glucosa.

ISOFORMAS	NÚMERO DE AMINOÁCIDOS	MONOSACARIDO QUE TRANSPORTA	LOCALIZACIÓN EN LOS TEJIDOS	FUNCIÓN
SGLT 1	664	Glucosa, Galactosa	Intestino delgado, nefrona proximal	Absorción y reabsorción de glucosa
SGLT 2	672	Glucosa, Galactosa	Nefrona proximal	Absorción y reabsorción de glucosa
SGLT 3	674	Glucosa, Galactosa	Sin determinar	Absorción y reabsorción de glucosa
SGLT4		Glucosa	Intestino y riñón	Transporte de glucosa
SGLT 5		Sin determinar	Intestino delgado y riñón	Sin determinar
SGLT6	675	Sin determinar	Intestino delgado y riñón	
GLUT 1	664	Glucosa, Galactosa	Eritrocito, barreras hematoencefálica, placentaria y de la retina, astrocito, nefrona.	Ingreso basal de glucosa
GLUT 2	522	Glucosa, Galactosa, Fructosa	Células β pancreáticas, hígado, intestino delgado, nefrona proximal.	Sensor de glucosa en páncreas, transporte de glucosa en la membrana basolateral de intestino y riñón
GLUT 3	596	Glucosa, Galactosa	Cerebro, placenta, hígado, riñón y corazón	Ingreso basal de glucosa
GLUT 4	509	Glucosa	Musculo esquelético, cardiaco, tejido adiposo	Ingreso de glucosa estimulado por insulina
GLUT 5	501	Fructosa	Yeyuno, espermatozoides, riñón, células de la microglia	Transporte de fructosa
GLUT 6	507	Glucosa	Cerebro, bazo y leucocitos	Ingreso de glucosa estimulado por insulina
GLUT 8	477	Glucosa	Testículos y placenta	Ingreso de glucosa
GLUT 9	540	Glucosa	Riñón e hígado	Ingreso de glucosa
GLUT 10	541	Glucosa	Hígado y páncreas	Ingreso de glucosa
GLUT 11	496	Glucosa	Músculo esquelético y corazón	Ingreso de glucosa
GLUT 12	617	Glucosa	Músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado	Ingreso de glucosa
GLUT 13	629	Glucosa	Cerebro	Ingreso de glucosa y mioinositol





2.1.4. METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

La digestión de los carbohidratos ocurre gracias a la acción de varias enzimas, inicia en la boca por la participación de la amilasa salival. En el estomago, la amilasa gástrica, degrada a los almidones. En el intestino delgado se degradan los polisacáridos hasta monosacáridos por medio de la amilasa intestinal y de la amilasa pancreática.¹²

Los monosacáridos atraviesan la pared del intestino delgado a través de los capilares y alcanzan la circulación portal, posteriormente la mayoría son captados por el hígado y otros tejidos. De ahí siguen diversas vías metabólicas de acuerdo con los requerimientos del organismo.

La glucosa es el principal monosacárido resultante de la digestión de los carbohidratos, aunque también se obtiene fructosa y galactosa. La glucosa puede realizar diferentes funciones, como por ejemplo la producción de energía por conversión a dióxido de carbono y agua, almacenamiento como glucógeno en el hígado, como triglicéridos en el tejido adiposo o conversión a cetoácidos, aminoácidos o proteínas.³

Para que la degradación oxidativa de glucosa sea completa, el piruvato debe convertirse en acetil-CoA, que ingresará al ciclo del ácido cítrico y formará CO_2 , H^+ y GTP (guanósín trifosfato).³

El hidrógeno transportado por el NAD (nicotinamina adenina dinucleótido) y el FAD (flavín adenín dinucleótido) entra en la cadena respiratoria mitocondrial, y finalmente es transferido hacia el oxígeno molecular. Este proceso, denominado fosforilación oxidativa, es el proceso que genera la mayor parte de la energía procedente de la oxidación de la glucosa.

Cuando las necesidades energéticas del organismo están cubiertas, el organismo almacena energía en forma de glucógeno, el cual es sintetizado y almacenado en el hígado. Por otra parte, una porción de acetil-CoA procedente de la glucólisis no puede ser consumida en el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbónicos y se convierte finalmente en triglicéridos, una reserva energética.^{3, 12, 13}





Por todo esto el conjunto de reacciones que conforman el metabolismo de los carbohidratos es complejo e interacciona con el metabolismo de los lípidos y de los aminoácidos.

2.1.5. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

La regulación de los niveles de carbohidratos en el organismo se lleva a cabo mediante la participación de varias hormonas como se observa en la tabla 2.

La insulina es una hormona producida por el páncreas para regular los niveles de glucosa en el organismo, también participa en el metabolismo de las grasas (triglicéridos) y proteínas.

El glucagón es un polipéptido de cadena simple. La hipoglucemia (concentración baja de glucosa en sangre) estimula su secreción, que se lleva a cabo en las células α de los islotes de Langerhans.

Su acción es opuesta a la de la insulina, debido a que es una hormona favorecedora del almacenamiento de energía. Actúa movilizandando las reservas endógenas en estado de ayuno. Estimula la glucogenólisis (producción de glucosa a partir de la degradación del glucógeno) y la gluconeogénesis (formación de glucosa, a partir de precursores no glucocídicos), así como la lipólisis en el tejido adiposo.^{3, 14}

La adrenalina inhibe la liberación de insulina, potencia la glucogenólisis hepática y muscular, incrementa la lipólisis, aumenta la gluconeogénesis. Obteniendo como respuesta final un incremento de glucosa en plasma.³

La hormona del crecimiento participa en la captación de glucosa en tejidos específicos como el músculo. Esto puede ser causado por la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, que inhibe el metabolismo de la glucosa.





La somatostatina es un polipéptido que actúa preferentemente en el hipotálamo y en células δ de los islotes pancreáticos. Inhibe la liberación de somatotropina por la hipófisis y la secreción de glucagón e insulina, regulando la relación entre estas hormonas.³

El cortisol es un glucocorticoide que estimula la gluconeogénesis, también participa inhibiendo el aprovechamiento de la glucosa en los tejidos periféricos. El aumento de la gluconeogénesis activado por glucocorticoides implica un aumento del catabolismo de las proteínas y una mayor captación de aminoácidos por el hígado.¹²

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) es una hormona pituitaria. Su función principal es estimular a la corteza de las glándulas suprarrenales para secretar un grupo de hormonas esteroideas llamadas glucocorticoides. Las hormonas glucocorticoides ayudan a controlar la utilización de glucosa así como de regular las funciones biológicas en momentos de estrés.^{3, 8}

Tabla 2. Regulación del metabolismo de carbohidratos.

HORMONA	ORIGEN	EFFECTO EN LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA	ACCIÓN HORMONAL
INSULINA	Células β del páncreas	Disminuye	Membrana celular, glucogénesis
GLUCAGON	Células α del páncreas	Aumenta	Glucogenólisis, gluconeogénesis
ADRENALINA	Medula suprarrenal	Aumenta	Glucogenólisis,
HORMONA DEL CRECIMIENTO	Pituitaria anterior	Aumenta	Antagonista de la insulina
SOMATOSTATINA	Células delta del páncreas, otros tejidos	Leve aumento	Inhibe la liberación de insulina y glucagón
CORTISOL	Corteza suprarrenal	Aumenta	Antagonista de la insulina.
HORMONA ADRENOCORTICOTROPA (ACTH)	Pituitaria anterior	Aumenta	Antagonista de la insulina





2.2. DIABETES MELLITUS

2.2.1. DEFINICIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es un padecimiento crónico que se caracteriza por un incremento de glucosa en sangre (hiperglucemia) provocado por una deficiencia en el funcionamiento del páncreas, el cual no produce una cantidad suficiente de insulina o el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce.¹⁴

2.2.1. CLASIFICACIÓN

Existen varios tipos de DM debidos a una compleja interacción entre genética y factores ambientales. En 1997 la Asociación Americana de Diabetes (ADA) clasificó a la diabetes en cuatro clases clínicas:¹⁵

- Diabetes tipo 1 o Insulinodependiente. (DM1)
- Diabetes Mellitus tipo 2 o Insulino-resistente. (DM2)
- Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)
- Otros tipos de Diabetes Mellitus

2.2.1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1 O INSULINODEPENDIENTE (DM1)

Es provocado por un mecanismo autoinmune, ocasionando la destrucción o desaparición casi total de las células β del páncreas esto ocasiona una deficiencia absoluta de insulina, por lo que para su tratamiento se requiere de la administración diaria de esta hormona.¹⁶

Suele presentarse en personas menores de 30 años. Sus síntomas consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), excesiva sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, cetoacidosis, trastornos visuales y cansancio.^{2,15}





2.2.1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2)

Se caracteriza por la desregulación de la liberación de insulina por las células β pancreáticas, junto con una resistencia a dicha hormona en tejidos periféricos, como el músculo, cerebro y el hígado.^{2, 16}

A diferencia de la DM1, la DM2 suele aparecer en la edad adulta aunque se han reportado la aparición de este padecimiento en jóvenes y niños. Este tipo de diabetes representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo, inactividad física, así como factores hereditarios.

Los síntomas pueden ser similares a los de la DM1 pero a menudo menos intensos. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse sólo cuando el paciente tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones.¹⁷

2.2.1.3. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL (DMG)

Aparece durante el embarazo. Por lo general este padecimiento desaparece después del parto, por ello se considera un periodo de anormalidad condicionado por la gestación.

Aún se desconocen las causas de la diabetes gestacional; sin embargo, se cree que cambios en la acción de la insulina son una respuesta a la adaptación del metabolismo materno para favorecer la disposición de los nutrientes requeridos por el feto para su desarrollo. Lo anterior provoca un estado de resistencia a la insulina, por lo que el organismo genera una mayor producción de insulina para compensar dicha resistencia, esto ocurre siempre y cuando exista una correcta función pancreática. Sin embargo, si las células del páncreas están lesionadas o son insuficientes para compensar esta demanda se desencadena entonces la hiperglucemia.¹⁸





2.2.1.4. OTROS TIPOS DE DIABETES MELLITUS

Son causadas por defectos genéticos en las células productoras de insulina, defectos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas (como la fibrosis quística), o daños provocados después de trasplante de órganos.^{15, 19}

2.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2

2.3.1. DEFINICIÓN

La DM2 es una enfermedad metabólica de origen endocrino, cuya principal característica es la hiperglucemia, provocada por la desregulación de la liberación de insulina por las células β -pancreáticas, junto con una resistencia a dicha hormona en tejidos periféricos.¹⁶

Es el tipo de Diabetes con mayor prevalencia en adultos, aunque ocasionalmente puede manifestarse en la juventud. Suele presentarse en mayor número en mujeres que en hombres. Entre el 2001 y 2005 la tasa de mortalidad por este padecimiento fue del 89.9% en mujeres y del 86.1% en hombres.^{1, 17}

2.3.2. SINTOMAS

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por ser prácticamente asintomática en sus fases iniciales. Provocando un retraso en el diagnóstico. Los síntomas característicos para este padecimiento son: excreción excesiva de orina (poliuria), excesiva sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio.^{2, 15}





2.3.3. FACTORES DE RIESGO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Los factores de riesgo para presentar DM2 son:

- Historia familiar de DM2.
- Edad, sobre todo en personas mayores de 45 años.
- Padecer sobrepeso u obesidad, sobre todo en personas con aumento en la circunferencia abdominal.
- Ser físicamente inactivos.
- Presentar colesterol o triglicéridos elevados.
- Tener antecedentes de enfermedad cardiovascular.
- Antecedentes de Diabetes gestacional.

Como factor predominante en pacientes con DM2 está la presencia de obesidad. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006 indican que siete de cada diez personas adultas presentan sobrepeso y obesidad.

Se ha observado que las personas obesas que acumulan grasa preferentemente alrededor de la cintura presentan una prevalencia de diabetes e hiperinsulinemia (niveles elevados de insulina en sangre) superior a las personas que tienen un exceso de grasa en la cadera.³

Otro estado clínico asociado a la DM2 es el síndrome metabólico, se ha estimado que la mayoría de los pacientes, en promedio el 75% que presentan este padecimiento o intolerancia a la glucosa (IGT, por sus siglas en inglés) tienen dicho síndrome.²

El Síndrome Metabólico o Síndrome X es un concepto clínico que se caracteriza por la asociación de diabetes mellitus, resistencia a la glucosa (IG), hipertensión arterial (HTA), obesidad, dislipidemia (DL), disfunción endotelial y aterosclerosis. Constituye un estado previo en el desarrollo de la Diabetes Mellitus tipo 2 e incrementa el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular.¹⁷





2.3.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

En las etapas iniciales de la enfermedad, la tolerancia a la glucosa sigue siendo casi normal, a pesar de la resistencia a la insulina, porque las células β del páncreas logran la compensación al incrementar la producción de la hormona. Al evolucionar la resistencia a la insulina y surgir hiperinsulinemia, los islotes pancreáticos en algunas personas no pueden conservar el estado hiperinsulinémico y en ese momento surge una intolerancia a la glucosa (IGT), que se caracteriza por incrementos en el nivel de glucemia posprandial. La disminución en la secreción de insulina y el incremento de la producción de glucosa por el hígado culminan en el desarrollo de diabetes con hiperglucemia en el ayuno. Por último surge una insuficiencia de las células β -pancreáticas.²

2.3.4.1. DAÑO EN LA SECRECIÓN DE INSULINA

La razón o razones de la disminución en la secreción de insulina en la DM2 no están claras, pero se cree que existe un segundo defecto genético (superpuesto a la resistencia a insulina) que afecta la función de las células β pancreáticas. Se ha observado la formación de depósitos de fibrillas amiloides en los islotes de diabéticos tipo 2 de larga evolución, esta amilina o polipéptido amiloide de los islotes es cosecretado con la insulina por las células β pancreática. Se ignora si estos depósitos de amiloide son un fenómeno primario o secundario al daño en la secreción de insulina.²

Además, de la formación de los depósitos de amilina, se sabe que ocurre una elevación de los valores de ácidos grasos libres, también empeora el funcionamiento de los islotes y disminuye la masa de las células β pancreáticas.





Se sabe que algunas de las funciones de la amilina es la inhibición de la secreción de glucagón, (que aumenta la producción hepática de glucosa) retarda el vaciamiento gástrico, tiene un efecto moderador sobre la absorción de glucosa, estimula la saciedad; de manera selectiva inhibe la utilización de glucosa y el glucógeno estimulado por la insulina, pero no afecta el metabolismo de la glucosa en el adipocito.

2, 17, 20

2.3.4.2. RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina, se refiere a una menor capacidad de la insulina para actuar eficazmente en los tejidos blanco particularmente; músculo, hígado y tejido graso. Para compensar esto, el páncreas descarga más insulina para tratar de mantener el nivel normal de glucosa en sangre. Gradualmente, las células que producen insulina en el páncreas se vuelven deficientes y por último disminuyen en su número ocasionando que el nivel de glucosa en sangre se incremente, y como consecuencia ocurre el desarrollo de Diabetes.^{17,}

Aun no se conoce el mecanismo preciso de la resistencia a insulina en la diabetes. Pero se cree que entre las causas están: disminución del número de receptores insulínicos, mutación de transportadores de glucosa, alteraciones específicas en la producción de GLUT-4, defectos en la traslocación intracelular del transportador y defectos en la vía de transporte.

Entre estas causas, la de mayor importancia parece ser la del transporte de glucosa particularmente la realizada por el transportador GLUT-4.^{2, 3}

En la resistencia a la insulina los niveles de receptor de insulina y de actividad tirosin cinasa están disminuidos, pero probablemente estas alteraciones son secundarias a la hiperinsulinemia y no un defecto primario. Por lo tanto, se cree que en la resistencia a la insulina el factor predominante lo constituyen defectos posteriores al receptor.^{6, 21, 22,}

23





Un defecto en las señales de la fosfo inositol 3 cinasa (PI-3) puede disminuir la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática. La insulina estimula dicha translocación de GLUT- 4 al unirse primero al receptor tirosina cinasa y activarla por fosforilación (en la parte intracelular) del IRS (substrato del receptor de insulina, por sus siglas en inglés) que parece ser un paso necesario para la acción de la insulina sobre el transporte de glucosa, para la translocación de GLUT-4 y para la síntesis de glucógeno.^{17, 20, 21, 22}

2.3.4.3. AUMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA HEPÁTICA.

El incremento de la producción de glucosa hepática ocurre en una fase temprana de la evolución de la diabetes, aunque probablemente es posterior al inicio de las alteraciones de la secreción de insulina y a la resistencia insulínica en el músculo esquelético. Este aumento en la producción de glucosa hepática es provocado por la hiperglucemia en ayunas así como de una disminución del almacenamiento de glucosa en el hígado en el periodo posprandial.²

2.3.5. COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

Las complicaciones crónicas de la DM pueden afectar muchos sistemas en el organismo y son causa de gran parte de la morbilidad y mortalidad que acompañan a este padecimiento. Las complicaciones crónicas pueden dividirse en vasculares y no vasculares.^{2, 3}

1) Complicaciones vasculares

Las complicaciones vasculares se subdividen en: Microangiopatías y Macroangiopatías





Microangiopatías:

Se presentan problemas circulatorios causados por daño en la pared de pequeños vasos sanguíneos por glicosilación proteica que altera las funciones de la capa interna de los vasos sanguíneos, matando a las células por falta de oxígeno, los tejidos se empiezan a lesionar provocando una alteración en su función.

a) Retinopatía. El exceso de azúcar provoca glicosilación de las proteínas y altera la retina. Se presentan pequeñas hemorragias en la parte interior de la retina, que la van desprendiendo de su sitio anatómico y se pierde la visión. Es una complicación a largo plazo, que tarda aproximadamente 15 años en presentarse.

b) Nefropatía. En la nefropatía la capacidad del riñón para funcionar comienza a disminuir. La causa exacta de esto se desconoce, pero se cree que la hiperglucemia no controlada lleva al desarrollo de daño renal, especialmente cuando también se presenta hipertensión.

La hiperglucemia daña los glomérulos provocando que estos se vuelvan gruesos y cicatricen. Con el tiempo, más vasos sanguíneos resultan destruidos. Las estructuras renales comienzan a tener filtraciones y la proteína (albúmina) empieza a eliminarse en la orina.

Macroangiopatías:

Afecta la pared de los grandes vasos sanguíneos, provocando aterosclerosis, placas de ateromas que obstruyen la circulación. En este caso, la glicosilación se produce sobre las lipoproteínas, se reduce la luz o flujo del vaso, una placa de ateroma obstruye un tramo del vaso por dentro (algo parecido a lo que ocurre cuando hay colesterol, en cuyo caso es arterioesclerosis) y puede producir infarto al miocardio.





Infarto al miocardio. Se presenta por la obstrucción de alguna de las arterias coronarias por placas de ateroma, provocando hipoxia y muerte en una zona del músculo cardiaco, lo que en consecuencia altera la función primordial del corazón.

2) Complicaciones no vasculares

Comprenden problemas como:

Gastroparesia. Es una complicación consecuencia de una neuropatía crónica. Consiste en una enfermedad que afecta el movimiento en el estómago disminuyendo la capacidad del vaciamiento gástrico. Esto hace que el estómago se dilate y no digiera los alimentos con la rapidez que debe hacerlo. En los pacientes con gastroparesia diabética los mecanismos de motilidad gástrica están alterados, sobre todo porque la neuropatía afecta al nervio vago y por la reducción de neuronas inhibitorias de la coordinación motora del tubo digestivo.

2.3.6. MECANISMOS DE LAS COMPLICACIONES

Aunque la hiperglucemia crónica es un factor importante en las complicaciones de la Diabetes Mellitus, se ignoran los mecanismos a través de los cuales provoca tanta diversidad de daños. Para explicar el modo en que la hiperglucemia podría provocar las complicaciones crónicas de la diabetes se han propuesto cuatro teorías principales.²

- Una teoría propone que el aumento de la concentración intracelular de glucosa da por resultado productos finales de glucosilación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés, advanced glycosylation end products) por la vía de la glucosilación no enzimática de proteínas intracelulares y extracelulares. La glucosilación no enzimática es una interacción de glucosa con grupos amino de las proteínas. Se ha demostrado que los AGEs forman enlaces cruzados entre proteínas, aceleran la aterosclerosis, promueven la disfunción glomerular, reducen la síntesis de óxido nítrico, inducen disfunción endotelial y alteran la composición y estructura de la matriz extracelular.





El valor sérico de AGEs guarda relación con la glucemia, y estos productos se acumulan a medida que disminuye la filtración glomerular.²

- Una segunda hipótesis se basa en que la hiperglucemia aumenta el metabolismo de la glucosa a través de la vía del sorbitol. La glucosa intracelular se metaboliza principalmente por fosforilación y posterior glucólisis, pero cuando está aumentada la glucosa intracelular, parte de ella se convierte en sorbitol por la acción de la enzima reductasa de aldosa. El aumento de las concentraciones de sorbitol altera el potencial oxido-reductor, incrementa la osmolalidad celular, generando un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno.
- La tercera hipótesis propone que la hiperglucemia incrementa la formación de diacilglicerol, esto da por resultado la activación de la proteína cinasa C (PKC). Entre otras cosas, la PKC modifica la transcripción de los genes de fibronectina, la colágena de tipo IV, proteínas contráctiles y proteínas de matriz celular de células endoteliales y neuronas.^{2,17}
- Una cuarta teoría plantea la posibilidad de que la hiperglucemia aumente la generación de glucosa 6 fosfato, por la vía de la hexosamina. La glucosa-6-fosfato es un sustrato necesario para la glucosilación y la producción de proteogluano. La vía de la hexosamina puede trastornar la función al glucosilar proteínas o al producir cambios en la expresión genética de las mismas.

Un posible mecanismo unificador consiste en que la hiperglucemia propicia la producción de especies reactivas de oxígeno o superóxido en las mitocondrias; estos compuestos pueden activar todas las vías descritas con anterioridad. Aunque la hiperglucemia actúa como factor desencadenante inicial de las complicaciones de la diabetes, aún no se sabe si entran en operación los mismos procesos fisiopatológicos en todas las complicaciones, o si predominan vías metabólicas determinadas en ciertos órganos.





2.4. INSULINA

2.4.1. DEFINICIÓN

El páncreas es un órgano glandular que se encuentra compuesto principalmente por dos tipos de tejidos, los acinos cuya función es secretar jugos digestivos que posteriormente llegaran hasta el intestino. Y los Islotes de Langerhans que a través de su secreción endocrina liberan insulina y glucagón hacia la sangre. Las células α (alfa), β (beta) y δ (delta) de los islotes de Langerhans secretan glucagón, insulina y somatostatina respectivamente.

La insulina es una hormona de origen proteico formada por dos cadenas polipeptídicas, la cadena A formada por 21 aminoácidos y la cadena B constituida por 30 aminoácidos, unidas por 2 enlaces disulfuro. La producción de insulina ocurre en los ribosomas de las células β de los islotes de Lanhergans del páncreas y consiste en la producción de una prohormona llamada pre-proinsulina (secuencia de 109 aminoácidos).

La pre-proinsulina pierde algunos aminoácidos al pasar por el retículo endoplasmático y se forma la proinsulina (secuencia de 81 aminoácidos). En el Aparato de Golgi, la hormona es plegada en su estructura nativa, y empaquetada en vesículas secretoras. Una proteasa específica rompe la molécula, formando insulina y péptido C, (que es una estructura de 30 aminoácidos que conecta las cadenas A y B de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente).^{3, 17, 24}

2.4.2. SECRECIÓN DE INSULINA

Existen diversas hormonas que estimulan la secreción de insulina, tales como las hormonas gastrointestinales (gastrina, secretina, colecistocinina, péptido gástrico inhibidor), ya que mientras se van ingiriendo los alimentos, estas hormonas producen una descarga de insulina a manera de preparación para los nutrientes que van a ser absorbidos.³





Los aminoácidos también ejercen estimulación sobre la secreción de insulina, pero de manera muy diferente a como lo realiza la glucosa. Esta regulación puede ser de forma aguda o crónica en la cual el metabolismo mitocondrial es fundamental para el acoplamiento de los aminoácidos y que se lleve a cabo la liberación de insulina por exocitosis.⁵

La secreción de insulina por las células β es regulada principalmente por los niveles de glucosa en sangre. Las concentraciones de glucosa que sobre pasan el valor de (70-110 mg por cada dL o 100 mL) estimulan la síntesis de insulina principalmente al intensificar la traducción y el procesamiento de la proteína. La glucosa comienza a estimular la secreción de insulina cuando aquella es introducida en la célula β por el transportador de glucosa GLUT-2.

La fosforilación por la glucocinasa es el paso limitante de la velocidad que controla la secreción de insulina regulada por glucosa. El metabolismo de la glucosa - 6- fosfato por la vía de la glucólisis genera ATP (adenosin trifosfato), que inhibe la actividad de canales sensibles a ATP.

Este canal consiste en dos proteínas separadas: una es el receptor de ciertos hipoglucemiantes orales (p. ej. sulfonilureas, meglitinidas), y el otro es una proteína de canal de potasio (K^+) rectificadora hacia el interior (Kir 6.2).⁸

En condiciones normales el canal iónico se encuentra abierto, pero se cierra después del metabolismo de la glucosa (cuando hay un incremento en la relación ATP/ADP). La inhibición de este canal del potasio induce la despolarización de la membrana de la célula β , lo que abre canales del calcio dependientes de voltaje (con entrada consecuente de calcio en la célula). El incremento en la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular activa la secreción de insulina por medio de exocitosis de los gránulos que contienen insulina (Figura 3).^{2, 8, 17}



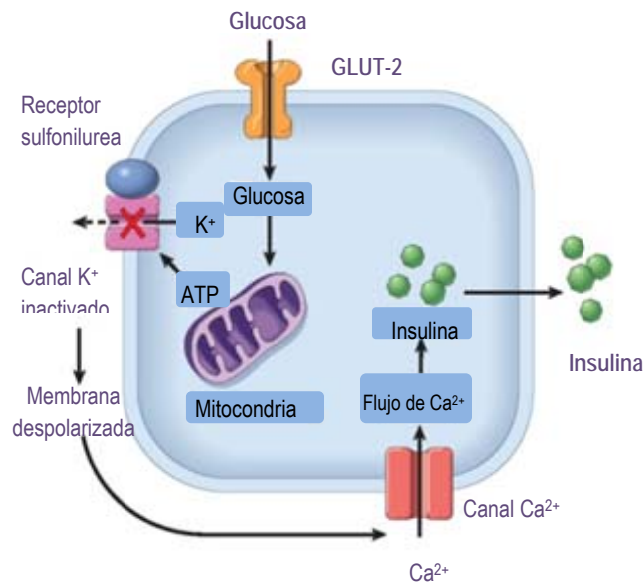


Figura 3. Entrada de glucosa a la célula mediante el transportador GLUT 2. El metabolismo de la glucosa provoca un cambio en la relación ATP/ADP, un incremento en esta, provoca el cierre del canal de potasio, esto a su vez provoca la despolarización de la membrana, se abre el canal de calcio dependiente de voltaje incrementando la entrada de Ca^{2+} a la célula, que activa la secreción de insulina.

2.4.3. ACCIÓN DE LA INSULINA

Una vez que se secreta la insulina hacia la sangre venosa portal, casi 50% de ella se degrada en el hígado. La insulina que no se metaboliza en el hígado llega a la circulación general, donde se fija a receptores de órganos diana.³

La función de la insulina es multifactorial y afecta a numerosos órganos y tejidos, aunque sus acciones más importantes se manifiestan en los tejidos hepático, muscular y adiposo (tabla 3).²

El primer órgano alcanzado por la insulina a través del flujo sanguíneo es el hígado. En donde promueve la síntesis y almacenamiento de glucógeno, al mismo tiempo que inhibe su degradación. Aumenta la síntesis de proteínas, triacilgliceroles. También estimula la glucólisis, Inhibe la glucogenólisis, cetogénesis y gluconeogénesis.¹⁶





En el músculo la insulina promueve la síntesis de proteínas al aumentar el transporte de aminoácidos, estimula la síntesis de glucógeno para reemplazar el utilizado en la actividad muscular; esto lo logra al incrementar el transporte de glucosa hacia la célula.²⁴

En el tejido adiposo la insulina promueve el almacenamiento de triacilglicerol en los adipocitos mediante diversos mecanismos: 1) induce la producción de lipoproteína lipasa, que hidroliza el triacilglicerol de las lipoproteínas circulantes: 2) aumenta el transporte de glucosa hacia los adipocitos, incrementa la disponibilidad de α glicerofosfato, sustancia utilizada en la esterificación de ácidos grasos libres a triacilglicerol: 3) inhibe la lipólisis al inhibir la lipasa sensible a hormona.^{2, 3}

Tabla 3. Funciones metabólicas de la insulina.

HÍGADO	MÚSCULO	TEJIDO ADIPOSO
Promueve la síntesis de glucógeno	Aumenta la captación de glucosa	Aumenta la captación de glucosa.
Incrementa la síntesis de triglicéridos.	Promueve la síntesis de glucógeno	Promueve la síntesis y el almacenamiento de triglicéridos
Promueve la síntesis de proteínas	Promueve la síntesis de proteínas	Promueve la activación lipoproteína lipasa.
Inhibe la glucogenólisis	Aumenta el transporte de aminoácidos	
Inhibe la gluconeogénesis		
Inhibe la cetogénesis		





2.4.4. RECEPTOR DE INSULINA

El receptor de insulina es una proteína tetramérica con dos subunidades alfa extracelulares y dos subunidades beta, tienen una pequeña porción extracelular, una porción transmembranal y una porción intracelular, se encuentra en mayor cantidad en tejido hepático y adiposo.¹⁶

En el receptor de insulina las subunidades beta son las subunidades catalíticas y las subunidades alfa son subunidades regulatorias que las mantienen inhibidas. Cuando la insulina se une a las subunidades alfa, la actividad inhibitoria de éstas sobre las subunidades beta se pierde. Entonces las subunidades beta ejercen su acción catalítica de tirosin-cinasa, las dos subunidades se transfosforilan (la una fosforila a la otra y viceversa) en 6-7 residuos de tirosina, sin ésta actividad tirosin-cinasa del receptor de insulina, no se observa ninguno de los efectos biológicos de la insulina.^{24, 25}

Las subunidades beta también poseen residuos de serina y treonina que se pueden fosforilar. Cuando esto sucede, la actividad tirosin-cinasa se reduce y todos los efectos insulínicos también.^{24, 25, 26.}

La mayoría de los efectos de la insulina son regulados por la fosforilación de sus sustratos endógenos IRS. Se han identificado cuatro receptores IRS (IRS-1 al IRS-4), los más estudiados han sido el IRS-1 y el IRS-2, que se encuentran ampliamente distribuidos en varios tejidos, mientras que IRS-3 está restringido de tejido adiposo, e IRS-4 a riñón y encéfalo.²⁷

El IRS-1 es una proteína rica en regiones de unión a tirosinas fosforiladas (regiones PTB del inglés Phospho Tyrosine Binding), que le permiten unirse al receptor y ser fosforilado en sus residuos de tirosina.

A pesar de que no se conoce del todo la importancia y las funciones de IRS-1 e IRS-2, estudios han mostrado que en términos generales los animales sin IRS-1 tienen baja talla y peso; mientras que los animales sin IRS-2 son diabéticos e insulinoresistentes.





La enzima fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) es probablemente la enzima de la cascada de señalización de insulina más extensamente estudiada. Es una proteína dimérica con una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85). La subunidad p85 se une a los IRS fosforilados y eso hace que cese su actividad inhibitoria sobre la subunidad p110.^{20, 28}

La subunidad p110 desinhibida fosforila varios fosfolípidos de membrana, principalmente el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI4,5P) para generar fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). El PIP3 es el encargado de fijar a la membrana y activar a PDK1 (Piruvato deshidrogenasa cinasa 1) y AKT, dos enzimas cinasas que median la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina (figura 4).^{29, 30}

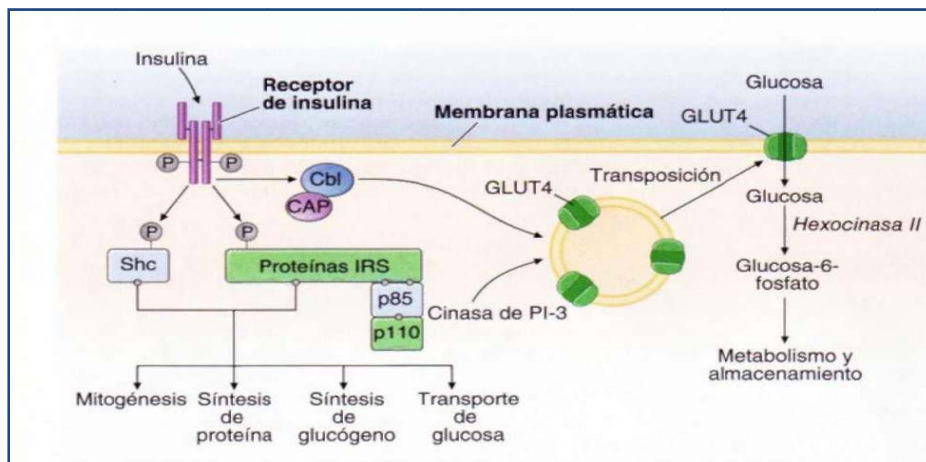


Figura 4. Vía de transducción de señales de la insulina en el músculo esquelético. La insulina que se fija a su receptor estimulando la actividad de de la cinasa de fosfatidilinositol (PIP-3) provocando la autofosforilación del receptor y la movilización de moléculas de señalización intracelulares, como los sustratos del receptor de insulina IRS. Estas proteínas adaptadoras y otras inician una cascada compleja de reacciones que estimulan la transposición de los transportadores de glucosa a la superficie celular, el cual es un paso esencial para la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo.²





2.5. AMINOÁCIDOS

2.5.1. DEFINICIÓN

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que poseen un grupo amino, un grupo carboxilo y un sustituyente (cadena lateral R), el grupo amino puede ser primario o secundario. En la mayoría de los aminoácidos naturales el grupo amino se encuentra enlazado al átomo de carbono α , el cual es el átomo más próximo al grupo carbonilo debido a esto son denominados α -aminoácidos (fig.5). En todos ellos el grupo α -amino es un grupo primario, es decir no tiene sustituyentes. La única excepción ocurre en la prolina, en el que el grupo amino es secundario.⁶

Los α -aminoácidos, con excepción de glicina, presentan un centro de quiralidad común; el carbono α . Por lo tanto, son posibles dos formas enantioméricas, teniendo las formas R o S, según la configuración de los sustituyentes en un centro de quiralidad.

Según la rotación del plano de luz polarizada pueden ser dextrorrotatorios (+) o levorrotatorios (-). De acuerdo a la posición del grupo amino en una proyección de Fisher (derecha o izquierda), son agrupados en D o en L. A los aminoácidos con configuración R le corresponde la forma D y a la S, le corresponde la L.⁶

En la figura 5. Se observa la estructura general de un α -aminoácido.

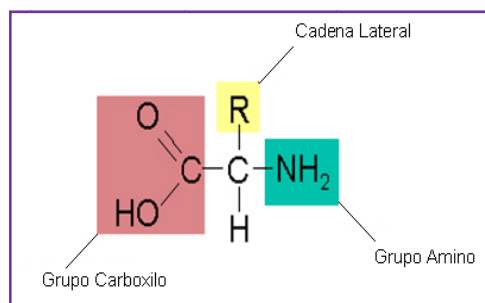


Figura 5. Estructura general de un aminoácido





2.5.2. CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

La clasificación más común de los aminoácidos es de acuerdo a la acidez y polaridad de los grupos presentes en las cadenas laterales (grupos R).

Clasificación de los aminoácidos según el sustituyente de la cadena lateral (Figura 7)

1) Aminoácidos con Carga

- Con carga (+) o Básicos
- Con carga (-) o Ácidos

2) Aminoácidos Neutros

- Largos Neutros
- Cadena Ramificada o Alifáticos
- Aromáticos
- Grupo Hidroxilo
- Grupo Amida
- Con Átomo de Azufre



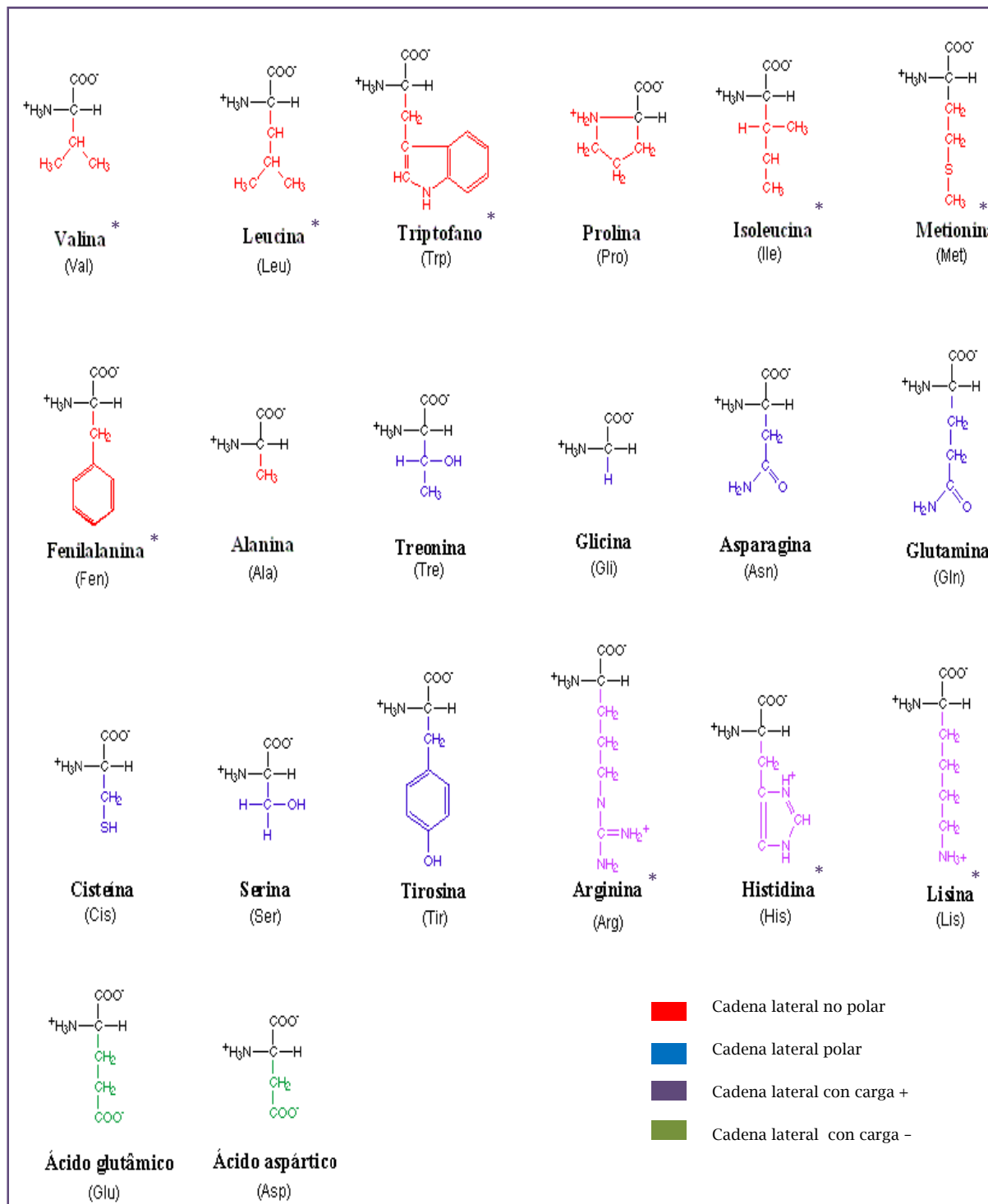


Figura 6. Clasificación de los aminoácidos de acuerdo al grupo funcional de la cadena lateral.

* Aminoácidos esenciales





2.5.3. IMPORTANCIA DE LOS AMINOÁCIDOS

Aunque se conocen más de 700 aminoácidos distintos en la naturaleza existen veinte aminoácidos, que prácticamente se encuentran en todas las proteínas.⁶

Estos aminoácidos pueden obtenerse de la dieta o de la degradación de proteínas. Por medio de la dieta se provee de los aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el organismo o la síntesis es limitada, estos son conocidos como aminoácidos esenciales. Los que pueden ser sintetizados por el organismo se conocen como aminoácidos no esenciales.

Además de servir como bloques de construcción para las proteínas, los aminoácidos intervienen en muchos otros procesos bioquímicos, también almacenan energía, si bien en forma menos eficiente que los carbohidratos y los lípidos. Sirven como materia prima en la biosíntesis de otros aminoácidos, aminas, alcaloides y neurotransmisores.⁷

El plasma y otros fluidos extracelulares contienen aminoácidos que están ligados o no a proteínas, en proporciones diferentes de las de los compartimientos intracelulares. Las proporciones son relativamente constantes (dependiendo con la edad) y reflejan, por lo tanto, las variaciones fisiológicas y también las alteraciones patológicas del metabolismo intermediario. Las alteraciones de su metabolismo pueden ser causadas por errores congénitos, es decir mutaciones del ADN que alteran la estructura de la proteína (enzimática, transporte, etc.) y con ello su función. Estas alteraciones afectan, en general al catabolismo y a veces al transporte de los aminoácidos, causando una acumulación de compuestos tóxicos, que pueden provocar un bloqueo metabólico.³





2.5.4. AMINOÁCIDOS Y SECRECIÓN DE INSULINA

El metabolismo de aminoácidos es esencial para una función normal de las células β pancreáticas. El mecanismo por el cual los aminoácidos confieren el efecto regulatorio en la actividad de la insulina es complejo y comprende al metabolismo mitocondrial.⁵

Aminoácidos específicos como: alanina, arginina, leucina e isoleucina (fig. 7), regulan la secreción de insulina por células β pancreáticas, esto se logra con ayuda de la actividad mitocondrial. La mitocondria genera ATP, el cual es el principal mensajero de enganche en la secreción de insulina. Los aminoácidos pueden jugar un papel importante en la secreción de insulina de forma directa o indirecta (a través de la generación de supuestos mensajeros de origen mitocondrial).

Aminoácidos derivados de proteínas de la dieta y los liberados de las células epiteliales intestinales, junto con la glucosa, estimulan la secreción de insulina, conduciendo a un aumento en la síntesis de proteínas y en el transporte de aminoácidos a tejidos blanco como el músculo esquelético.^{2, 31}

En períodos de ayuno, la liberación de aminoácidos a partir de músculo esquelético principalmente L-glutamina y L-alanina pueden regular la liberación de glucagón (hormona que incrementa el nivel de glucosa) por las células α pancreáticas, las cuales posteriormente pueden influir en la secreción de insulina.

Los aminoácidos provenientes de los alimentos pueden estimular la liberación de incretinas (serie de hormonas que se producen en el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos), por ejemplo, el GLP-1, a partir de las células intestinales y de esta manera estimular la secreción de insulina a través de mecanismos indirectos.³²





Los mecanismos por los cuales los aminoácidos pueden aumentar la secreción de insulina son variadas, por ejemplo L-Arginina, lo hace al despolarizar la membrana plasmática a pH neutro, pero esto sólo se logra en presencia de glucosa, mientras que otros aminoácidos, que participan en el co-transporte con sodio (por ejemplo la alanina) también puede despolarizar la membrana como consecuencia del transporte de Na^+ y por tanto inducir la secreción de insulina mediante la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje. Lo anterior provoca una oxidación parcial, por ejemplo L-alanina, inicialmente puede aumentar el contenido celular de ATP, provoca el cierre del canal sensible a potasio, la membrana plasmática se despolariza, se abre el canal de calcio, ocurre un incremento intracelular de calcio (Ca^{2+}) y este aumento induce la liberación de insulina.⁵

También se ha observado que los aminoácidos activan la proteína diana de la rapamicina en los mamíferos (mTOR del inglés, mammalian target of rapamycin) sin embargo no se sabe como logran activar a este complejo, es probable que la estimulación de una cinasa o la inhibición de la fosfatasa que actúan sobre mTOR como sustrato esté involucrado.³³

La importancia de la activación del complejo mTOR radica en que es componente de una vía de señalización de estimulación de los receptores de insulina y de la regulación de la disponibilidad de nutrientes. La leucina es el aminoácido más eficaz en este sentido.³³

Los aminoácidos han demostrado ser importantes reguladores de la actividad de la enzima proteína cinasa activada por AMP (AMPK). La AMPK ejerce una importante actividad regulatoria en la homeostasis de la energía celular debido a su capacidad para detectar cambios en la relación AMP/ATP, regula la secreción de insulina pancreática, absorción de glucosa en el músculo entre otros.³¹ Se propuso que los aminoácidos regulan AMPK a través de cambios en la relación de ATP/AMP en el citosol y de la fosforilación de la cinasa LBKI, un regulador de la actividad de la AMPK.

5, 34



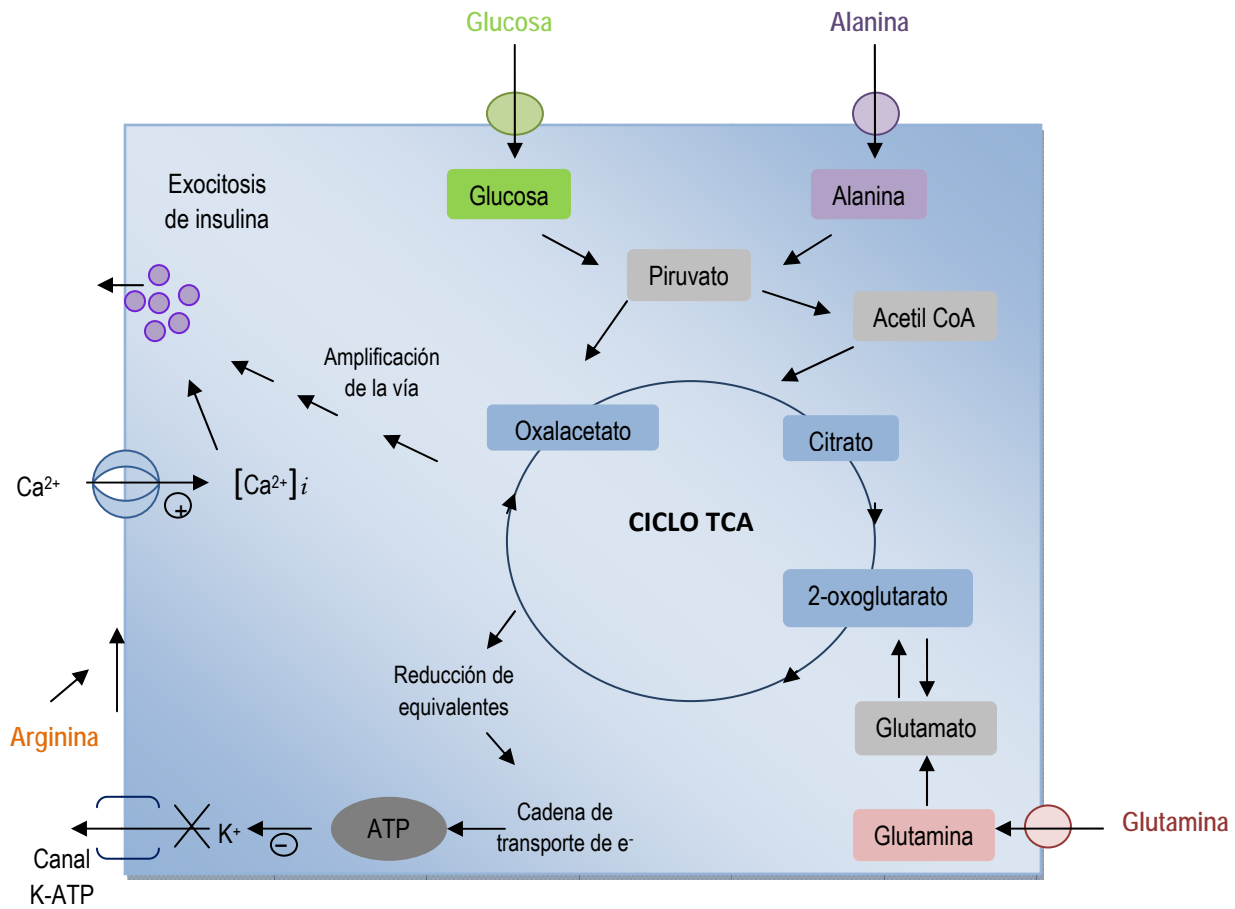


Figura 7. Modelo de la regulación de la secreción de insulina por los aminoácidos en células estimuladas por la glucosa. La glucosa se metaboliza a través de la glucólisis produciendo piruvato que posteriormente participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El metabolismo Mitocondrial también se activa por aminoácidos como la; alanina, glutamina o glutamato. El ciclo de Krebs genera la reducción de los equivalentes, que son transferidos a la cadena de transporte de electrones, dando lugar a la producción de ATP. El aumento de los niveles de ATP provoca el cierre de los canales K-ATP y despolariza la membrana celular. Esto abre el canal de Ca²⁺ dependientes de voltaje, el aumento de Ca²⁺ intracelular desencadena la exocitosis de los gránulos de insulina. Señales metabólicas adicionales pueden ser generados a partir de intermediarios del ciclo TCA, y ampliar la concentración de Ca²⁺ para la estimulación de la exocitosis de insulina.⁵





III METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. CROMATOGRAFÍA

3.1.1. FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método físico de separación de los componentes de una mezcla, en el que las sustancias que se van a separar se distribuyen entre dos fases: una móvil y una estacionaria. El principio de esta técnica se basa en procesos de equilibrio de distribución de los compuestos presentes en la mezcla con la fase móvil y la fase estacionaria.²³

Cada componente presente en la muestra va a interactuar de manera diferente con las dos fases. Los componentes que muestran una mayor afinidad con la fase estacionaria son fuertemente retenidos y avanzan lentamente con el flujo de la fase móvil. Por el contrario, los componentes con menor afinidad a la fase estacionaria son débilmente retenidos y avanzan rápidamente con la fase móvil, logrando así la separación de los componentes de una muestra.³⁵

3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA O HPLC

HPLC (por sus siglas en inglés High performance liquid chromatography). Es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. La fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria.

En cromatografía líquida, cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil no-polar, se denomina sistemas normales, o de fase normal. En estos sistemas, la retención del soluto se incrementa generalmente con su polaridad.



Por otra parte, si la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, el sistema se denomina como de fase inversa y en estos, las especies polares tienen poca afinidad por la fase estacionaria, siendo eluidos más fácilmente.³⁶

3.2.1. APLICACIONES DE HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica cuantitativa, y altamente sensible, capaz de producir una buena resolución entre compuestos químicamente similares, por ejemplo, aminoácidos y vitaminas. En el caso de trabajar con aminoácidos el único inconveniente de esta técnica es que es necesaria la preparación de derivados (mediante reacciones de derivatización) antes o después de la separación cromatográfica, ya que por sí solos los aminoácidos no son detectados fácilmente por UV o fluorescencia.

La reacción de derivatización consiste en una amplia gama de reacciones químicas fundamentalmente orientadas hacia la transformación de los analitos en nuevas especies que sean compatibles con el sistema cromatográfico en sus diferentes módulos como por ejemplo; con la fase móvil, con el sistema de inyección, con la columna cromatográfica y el detector.

Las reacciones de derivatización generalmente se refieren a transformaciones químicas irreversibles de los analitos.⁴¹ Los reactivos más utilizados para una reacción de derivatización son; ninhidrina, o-ftalaldehído (OPA), fenilisotiocionato, cloruro de 5-dimetilamino-1 naftalensulfonilo (dansyl) y 9 fluorenilmetilcloroformato (FMOC).

Las reacciones de derivatización se dividen en precolumna y postcolumna.





La derivatización postcolumna involucra los siguientes pasos:

Separación de los aminoácidos en la columna cromatografica, introducción de un reactivo de derivatización en el sistema efluente de la columna; paso de los líquidos combinados a través de un colector mezclador seguido por un espiral de reacción y finalmente bombeo de los aminoácidos derivatizados a través de un sistema de detección. Generalmente la separación se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico.

En la derivatización precolumna la mezcla de aminoácidos se hace reaccionar con el agente de derivatización antes de que los aminoácidos sean separados. La derivatización precolumna elimina la necesidad de utilizar reactores postcolumna costosos, y los derivados hidrofóbicos de los aminoácidos pueden separarse de manera rápida y eficientemente con una columna en fase reversa.





3.2.2. INSTRUMENTACIÓN

Un equipo de HPLC está conformado de varios módulos con funciones definidas, que pueden estar integrados en la misma carcasa como es en el caso de los modelos estándar, o bien se presentan en diferentes bloques.³⁷

Los componentes básicos de un sistema para HPLC (fig. 8) son:

- A) Depósitos para la fase móvil (disolventes)
- B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- C) Sistema de inyección de muestras
- D) Columna cromatográfica
- E) Termostatos para las columnas
- F) Detectores
- G) Sistema para el tratamiento de datos y registrador

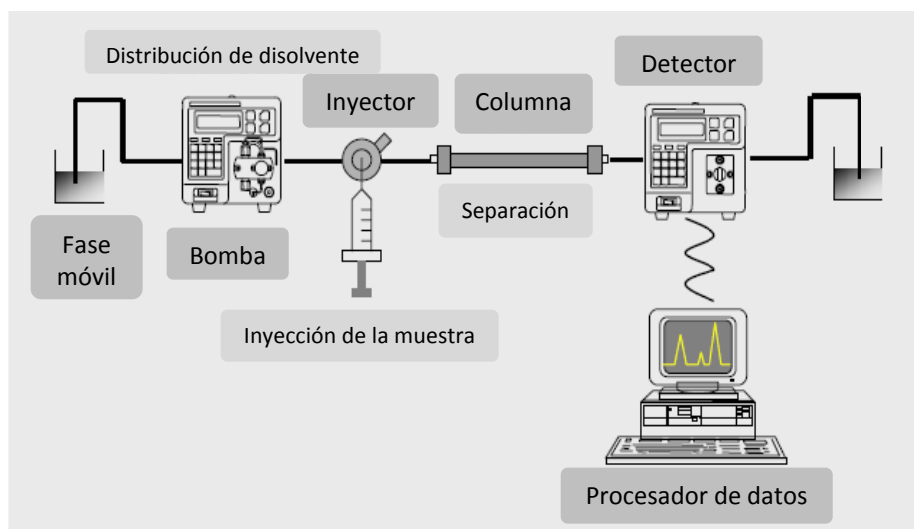


Figura 8. Componentes básicos de un equipo de HPLC





3.2.2.1. DEPÓSITOS PARA LA FASE MÓVIL

La fase móvil es una disolución o mezcla de disoluciones que se desplaza por el sistema cromatográfico, logrando así la separación de los compuestos. Frecuentemente los contenedores para las fases móviles son recipientes de vidrio que generalmente incluyen accesorios para eliminar los gases disueltos y partículas en suspensión de los líquidos.

Es importante evitar la presencia de gases en la fase móvil, ya que estos pueden formar burbujas en la columna provocando ensanchamiento en las señales además de que las burbujas y las partículas interfieren en el rendimiento de muchos detectores. Una forma de degasificación es por filtración mediante vacío en línea o microvacío e introducción de gas inerte como Argón o Helio que reemplaza otros gases disueltos.³⁸

Aunque la separación de muchas mezclas se lleva a cabo utilizando un disolvente de composición constante, conocida como elución isocrática, en ocasiones se usa la elución por gradiente, en la cual se cambia la composición de la fase móvil durante el análisis, con esto se logra aumentar la eficiencia de la separación de los componentes de la mezcla.³⁶

3.2.2.2. BOMBAS

Todos los equipos de HPLC incluyen al menos una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna en la que el relleno, por encontrarse muy compactado, es responsable de una sobrepresión a nivel del inyector. Esta presión puede alcanzar los 20000 kPa (200 bares) dependiendo de algunas características de la fase móvil como; la cantidad de fase a fluir, viscosidad así como del tamaño de las partículas de la fase móvil.³⁷





Debido a esto las bombas a utilizar deben de ser muy potentes y precisas. Los sistemas de bombeo deben ser capaces de generar presiones superiores a 6000 psi (lbs/in²), cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 ml/min, estar libre de pulsaciones y sus componentes deben ser resistentes a la corrosión.³⁹

3.2.2.3. SISTEMAS DE INYECCIÓN DE LA MUESTRA

Frecuentemente un factor limitante en la precisión al trabajar con un equipo de HPLC, es la reproducibilidad con que se debe de introducir la muestra en la columna, en la cual debe de inyectarse un volumen preciso en un corto periodo de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación establecido en la columna y en el detector.

Los volúmenes que se emplean deben de ser muy pequeños, de 20 µl hasta 500 µl. El método más utilizado para la introducción de la muestra se basa en la utilización de dispositivos en forma de bucle, que pueden introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi. Para realizar esto, se utiliza una válvula de alta presión de varias vías, manual o automatizada.^{37, 39}

3.2.2.4. COLUMNAS

La columna es un tubo recto de acero calibrado, (a veces forrado de un material inerte de vidrio o en PEEK[®]) que mide entre 10 y 30 cm de longitud. Tradicionalmente se utiliza un diámetro interno de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10 µm. Frecuentemente, la columna está precedida de una precolumna corta (0.4 a 1cm), rellena de la misma fase estacionaria que retiene los compuestos contaminantes, de esta manera se logra aumentar la duración de la vida de la columna cromatográfica.^{37, 40}





3.2.2.5. TERMOSTATOS PARA LA COLUMNA

En muchas aplicaciones, no es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, y suelen utilizarse columnas a temperatura ambiente. Sin embargo, es frecuente que se obtengan mejores cromatogramas al mantener constante la temperatura de las columnas.³⁸

Al controlar la temperatura se logra obtener áreas y tiempos de retención más reproducibles. El incremento en la temperatura mejora la desorción de los analitos disminuyendo el coqueo de los picos, el tiempo de retención, también disminuye la viscosidad y por lo tanto disminuye la presión.

3.2.2.6. DETECTOR

El detector es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal que puede dar información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física.

Los detectores son de dos tipos; Los detectores basados en una propiedad de la fase móvil que responden a cambios; en el índice de refracción, en la constante dieléctrica o la densidad, las cuales se modifican por la presencia de los analitos y los detectores basados en una propiedad del soluto (muestra) como es la absorción UV, fluorescencia, actividad óptica etc.³⁹

El detector ideal debe mostrar alta sensibilidad, capacidad para monitorear continuos efluentes de la columna, bajo nivel de ruido, línea base estable, insensibilidad a cambios en la temperatura y respuesta a todo tipo de compuestos.³⁵





3.3. CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

La determinación de aminoácidos plasmáticos se realizó de acuerdo a un método de referencia indicado por el equipo de HPLC marca Agilent, que establece la determinación de aminoácidos presentes en proteínas/hidrolizados proteicos, vía una derivatización precolumna (Apéndice 1).

3.3.1. DISOLUCIONES

- Disolución Krebs Ringer

La disolución Krebs Ringer acidificada se utilizó como medio para las disoluciones de los estándares y como blanco. Se acidificó para mantener la estabilidad de los aminoácidos.

Para su elaboración se pesó la masa necesaria para obtener un volumen final de 250mL con una concentración de; 138mM de NaCl, 11mM de KCl, 1.5mM CaCl₂, 1mM de MgCl₂, 11mM de NaHCO₃ y 1mM de NaH₂PO₄. Se disolvieron las sales con agua en un vaso de precipitados de 250 mL y se ajustó el pH a 3.0 con ácido clorhídrico 0.1 M.

- Fase móvil

Fase móvil A consistió en una disolución 40 mM de fosfato dibásico de sodio a pH 7.8.

La fase móvil B se preparó mezclando: acetonitrilo:metanol:agua, en una proporción de 40:45:10.





3.3.2. CURVA DE CALIBRACIÓN

Para la cuantificación de los aminoácidos fue necesario la realización de una curva de calibración, utilizando el método de estándar externo. Se prepararon soluciones de concentración 10 mM para cada uno de los aminoácidos. Posteriormente todas las soluciones de los aminoácidos fueron mezclados, llegando así a una misma disolución de concentración aproximada de 200 μ M. A partir de esta disolución denominada “disolución Madre” se realizaron disoluciones seriadas hasta llegar a la concentración de 0.0009 μ M.

1. Pesar la masa necesaria para preparar 10 mL de una disolución 10 mM de cada aminoácido (Apéndice 2).
2. En un vaso de precipitados de 10 mL disolver con HCl 0.1 M. (excepto para la glutamina que se disuelve en agua).
3. Trasvasar a un matraz aforado de 10 mL y aforar.
4. Sonicar las disoluciones durante 1 o 2 minutos.
5. Preparar la disolución Madre mezclando cada una de las diluciones preparadas anteriormente de cada aminoácido.
6. En un matraz de 10 mL colocar 200 μ L de la disolución madre y aforar con la disolución Krebs Ringer Acidificada. (disolución final 200 μ M).
7. Colocar 800 μ L de la disolución anterior en un tubo eppendorf y añadir 80 μ L de disolución Krebs Ringer Acidificada (DKRA) (disolución 181.8 μ M).
8. Colocar 600 μ L de la disolución anterior en un tubo eppendorf y añadir 300 μ L de DKRA (disolución 121.2 μ M).
9. Realizar diluciones seriadas tomando 500 μ L de la disolución anterior y agregar 500 μ L disolución Krebs Ringer Acidificada (DKRA), hasta llegar a una concentración final de 0.0009 μ M.





Tabla 4. Masa pesada de cada aminoácido para la curva de calibración

Aminoácido	Masa molecular (g/mol)	Masa pesada (g)	Concentración real de la solución madre (μM)
Aspartato	133.1	0.0133	198
Glutamato	147.13	0.0147	198
Asparagina	132.12	0.0133	197
Serina	105.1	0.0105	198
Glutamina	146.15	0.0146	198
Histidina	155.16	0.0155	198
Glicina	75.07	0.0075	195
Treonina	119.12	0.0119	196
Citrulina	175.19	0.0175	197
Arginina	174.2	0.0174	196
GABA	103.12	0.0103	198
Tirosina	181.19	0.0181	196
Valina	117.15	0.0119	203
Metionina	149.21	0.0149	195
Triptófano	204.23	0.0204	195
Fenilalanina	165.19	0.0165	196
Isoleucina	131.18	0.0131	196
Leucina	131.18	0.0132	197





3.3.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El tratamiento de las muestras de plasma consistió en la extracción de una muestra sanguínea mediante punción venosa, utilizando un tubo con EDTA como agente anticoagulante para lograr obtener el plasma. Posteriormente el plasma fue deproteinizado con acetonitrilo, y se centrifugó.

1. Extraer una muestra sanguínea en un tubo de 4 ml con EDTA
2. Centrifugar la muestra sanguínea a 15000 rpm durante 15 min.
3. Separar el plasma de las muestras sanguíneas, almacenar en refrigeración a -70 °C hasta la realización de la cuantificación de los aminoácidos.
4. Tomar 200 μ L de plasma y colocarlos en un tubo eppendorf
5. Agregar 200 μ L de acetonitrilo frío.
6. Agitar en vortex formando un precipitado y enfriar 10 min a 4°C.
7. Centrifugar 7 min. a 14000 rpm.
8. Separar el sobrenadante filtrando la muestra con un filtro de jeringa de 0.45 μ m.
9. Hacer una dilución 1/20 (colocando 190 μ L de Ringer Acidificado y 10 μ L del plasma filtrado en un tubo eppendorf).
10. Tomar 20 μ L de la dilución y colocarlos en un inserto.
11. Colocar el inserto en un vial.
12. Iniciar el análisis en el equipo de HPLC.

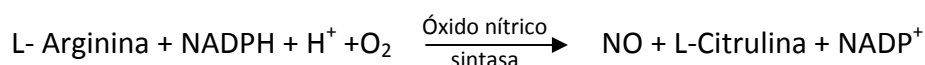




3.4. CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS

Aminoácidos como la arginina pueden metabolizarse y producir radicales libres (RL) como por ejemplo nitritos, provocando de esta manera estrés oxidativo (EOx) en el organismo.⁴²

La arginina puede sintetizar citrulina y óxido nítrico (NO) esta reacción se lleva a cabo con la participación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés) La reacción general se representa a continuación.



El óxido nítrico se metaboliza en moléculas más estables; nitratos y nitritos. Para realizar la cuantificación de nitritos, estos se hacen reaccionar con el reactivo de Griess para formar un producto azoico de color púrpura el cual posteriormente se detecta a 546 nm en un espectrofotómetro UV/visible.

En la reacción de Griess (Figura 11) ocurre un acoplamiento de sulfanilamida diazoada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED) formando un producto de color purpura rojizo a valores de pH ácido (2.0-2.5).

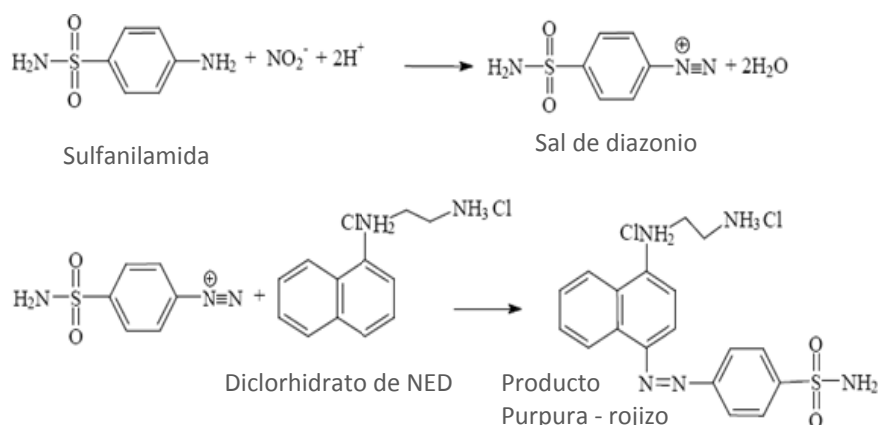


Figura 11. Reacción de Griess.





IV RESULTADOS

4.1. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Se trabajó con un equipo de HPLC de marca Agilent, modelo 1100. Conformado por una cabina para disolventes, un degasificador de vacío, una bomba binaria de doble pistón y alta presión con cámara mezcladora de disolventes y amortiguador, inyector automático con muestreador de placa de pocillos, modulo de temperatura contralada para el muestreador, un compartimiento termostatzado para columnas y un detector de fluorescencia.

La columna utilizada para el análisis de los aminoácidos fue de fase reversa marca Agilent zorbax eclipse C18 AAA solvent saber plus de dimensiones; 3.0 mm de diámetro interno, 150 mm de largo y 3.5 μ M de tamaño de partícula. La temperatura se estableció a 40°C.

El flujo y la aceleración de la bomba fueron de 1.000 mL/min y 100.00 mL/min² respectivamente.

Para la detección de los aminoácidos, se realizó una derivatización precolumna utilizando el reactivo OPA (o-ftalaldehido). Se programo el detector de fluorescencia para excitar a una longitud de onda de 340 nm y medir la energía emitida por los compuestos fluorescentes a 450 nm.

El método de inyección (Apéndice 3) utilizado fue por gradiente, el cual consistió de una meseta inicial de 0% de fase móvil B seguida de un incremento lineal, hasta llegar a un 100% de manera súbita y posteriormente regresar a un 0%. En fase reversa, debido a que la fase móvil A es polar y la fase móvil B es no polar. El incremento de La fase móvil B disminuye la polaridad de la fase móvil promoviendo la elución de los compuestos.



Los aminoácidos analizados en este trabajo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Aminoácidos analizados

AMINOÁCIDOS		
Aspartato	Glicina	Valina
Glutamato	Treonina	Metionina
Asparagina	Citrulina	Triptófano
Serina	Arginina	Fenilalanina
Glutamina	GABA	Isoleucina
Histidina	Tirosina	Leucina

Después de la inyección de las muestras en el equipo de HPLC se obtuvieron sus respectivos cromatogramas (Apéndice 4) para calcular la concentración de cada aminoácido analizado utilizando una curva patrón. Posteriormente, para determinar en qué casos los aminoácidos se encontraban con diferencias significativas en comparación con su grupo control, se realizó una prueba estadística t student comparando primero al grupo control masculino adulto con el grupo con DM2 (adultos) después se realizó para los adultos mayores, se repitió este mismo análisis para el grupo femenino. También se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) comparando al grupo diabético femenino con el grupo diabético masculino en adultos y adultos mayores para determinar el efecto del género en los niveles de aminoácidos en diabéticos.





4.1.1. POBLACIÓN EN ESTUDIO

Para el trabajo experimental se decidió estudiar una población mexicana formada por hombres y mujeres. Se tomó como referencia un grupo control (individuos sanos) y otro con DM2 como se muestra en la tabla número 6 en el caso de los hombres y la tabla número 7 para las mujeres.

La población en estudio se encontraba entre dos rangos de edad; por lo que fueron clasificados en adultos; con edad entre 40 a 59 años y en adultos mayores con una edad de 60 años en adelante.

En las tablas 6 y 7 también se reportan estudios de química sanguínea, para tener información que indica de manera general el estado metabólico de los individuos, el cual se encuentra alterado en individuos que padecen DM.

Los niveles de glucosa en el grupo control se encuentran dentro de los valores normales. En el grupo masculino con DM2, estos se encuentran elevados con un valor promedio de; 188.1 ± 103 y 173.5 ± 99 en adultos y adultos mayores respectivamente. En el grupo femenino con DM2 los valores de glucosa también se encuentran elevados; 159.3 ± 48 y de 160.7 ± 72 (tabla número 7).

En la población en estudio los valores de ácido úrico, creatinina y colesterol se encontraron en niveles normales, como se muestran en la tabla número 6 y en la tabla número 7.

En el caso de los niveles de triglicéridos, se encontraron elevados en el grupo; masculino adulto con DM2 con un valor promedio de 242.2 ± 20 mg/dL y en el grupo femenino adulto mayor con DM2 con un valor promedio de 211.1 ± 193.1 mg/dL.

Los valores de HDL se encontraron elevados en el grupo; masculino adulto con DM2 con un valor de 82.3 ± 94.2 mg/dL.

El valor de la Hemoglobina glicada en pacientes con DM2 se encontraron elevados, con valores promedio entre 8-9%.



**Tabla 6. Características de la población en estudio. Género masculino**

PARAMETRO	GRUPO CONTROL		GRUPO CON DM2	
	Adulto	Adulto mayor	Adulto	Adulto mayor
N	10	21	12	16
Edad (años)	55.6 ± 3.5	70.9 ± 8.4	52.1 ± 4.1	72.1 ± 7.4
Glucosa (mg/dL)	110 ± 1.3	110 ± 2.4	188.1 ± 103*	173.5 ± 99*
Ácido úrico (mg/dL)	5.8 ± 0.9	5.7 ± 1.1	4.6 ± 1.7	5.1 ± 1.6
Creatinina (mg/dL)	1.1 ± 0.8	1.1 ± 0.7	1.6 ± 1.0	1.1 ± 0.2
Colesterol (mg/dL)	184 ± 3.2	187 ± 6.3	195.0 ± 16.1	189.0 ± 33.7
Triglicéridos (mg/dL)	153 ± 6.9	155 ± 5.4	242.2 ± 20*	144.0 ± 61.5
HDL (mg/dL)	44 ± 2.1	47 ± 1.8	82.3 ± 94.2*	46.34 ± 13.9
Hb (%)	5.6 ± 0.3	5.8 ± 1.3	9.7 ± 2.9*	8.04 ± 2.5*

* Valores fuera de los normales.

Tabla 7. Características de la población en estudio. Género femenino

PARAMETRO	GRUPO CONTROL		GRUPO CON DM2	
	Adulto	Adulto mayor	Adulto	Adulto mayor
N	20	46	13	18
Edad (años)	55.0 ± 3.5	69.4 ± 6.7	50.4 ± 4.1	68.0 ± 6.1
Glucosa (mg/dL)	109 ± 1.3	110 ± 2.4	159.3 ± 48*	160.7 ± 72*
Ácido úrico (mg/dL)	3.6 ± 0.9	3.4 ± 1.0	3.0 ± 0.7	4.4 ± 1.3
Creatinina (mg/dL)	1.0 ± 0.8	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.9
Colesterol (mg/dL)	182 ± 1.3	185 ± 2.0	184.0 ± 38.4	196.8 ± 49.3
Triglicéridos (mg/dL)	131.0 ± 2.7	134 ± 3.8	157.9 ± 130.0	211.1 ± 193.1*
HDL (mg/dL)	40.0 ± 1.5	42 ± 1.0	47.0 ± 24.0	49.1 ± 11.1
Hb (%)	5.6 ± 0.3	5.7 ± 1.2	8.8 ± 2.0*	7.8 ± 1.9

* Valores fuera de los normales.





4.1.2. GÉNERO MASCULINO

Para el género masculino (adulto) se encontraron diferencias significativas en los aminoácidos: glutamato, serina, glutamina, arginina, isoleucina y leucina.

La glutamina y arginina se encontraron disminuidos en individuos con DM2 en comparación con el grupo control. Glutamato, serina, leucina e isoleucina se encontraron elevados en el grupo con DM2.

Para los adultos mayores se encontraron diferencias significativas en los aminoácidos: serina, arginina, isoleucina y leucina. En este caso únicamente la arginina se encontró en menor concentración en el grupo diabético con respecto al grupo control. Estos resultados se muestran en la tabla número 8.

En las figuras 12 y 13 se muestran la tendencia de los aminoácidos que se evaluaron para el grupo masculino. Las figuras muestran la tendencia de los aminoácidos expresado en porcentaje de cambio con respecto a los valores medios (media estadística) de los grupos controles.

Valores negativos indican una disminución en la concentración de aminoácidos plasmáticos en el grupo con DM2 con respecto al grupo control.

Valores positivos indican un aumento en la concentración de aminoácidos plasmáticos en el grupo con DM2 con respecto al grupo control.



Tabla 8. Concentración de aminoácidos en (μMol). Género masculino.

AMINOÁCIDOS	ADULTO		ADULTO MAYOR	
	CONTROL	DM2	CONTROL	DM2
L-Aspartato	2.8 \pm 0.4	14.6 \pm 5.8	3.2 \pm 0.5	11.4 \pm 3.0
L-Glutamato	49.5\pm9.0*	107.5\pm16.6*	49.2 \pm 8.1	108.8 \pm 19.4
L-Asparagina	37.6 \pm 1.4	45.3 \pm 3.3	33.9 \pm 1.8	40.4 \pm 2.5
L-Serina	90.8\pm5.6*	117.3\pm9.1*	76.7\pm3.4***	112.5\pm6.3***
L-Glutamina	661.3\pm65.7**	475.6\pm28.6**	512.5 \pm 36.7	473.4 \pm 34.4
L-Histidina	88.6 \pm 15.6	86.3 \pm 4.1	93.7 \pm 10.9	87.5 \pm 4.0
L-Glicina	259.3 \pm 32.0	236.6 \pm 17.9	238.1 \pm 17.2	254.0 \pm 28.5
L-Treonina	109.5 \pm 8.7	144.9 \pm 14.6	110.0 \pm 7.2	126.3 \pm 6.3
L-Citrulina	32.6 \pm 3.0	32.7 \pm 5.5	38.2 \pm 2.4	29.9 \pm 2.5
L-Arginina	57.5\pm5.8*	33.7\pm5.6*	59.4\pm4.6***	29.0\pm2.9***
GABA	2.0 \pm 0.5	2.5 \pm 0.2	1.6 \pm 0.5	2.5 \pm 0.4
L-Tirosina	62.4 \pm 6.7	73.2 \pm 5.5	79.8 \pm 6.7	61.6 \pm 3.6
L-Valina	221.8 \pm 12.7	275.4 \pm 25.1	192.9 \pm 9.8	217.6 \pm 10.6
L-Metionina	28.0 \pm 2.2	30.1 \pm 2.5	31.4 \pm 2.6	26.5 \pm 1.5
L-Triptófano	53.2 \pm 2.4	55.0 \pm 4.0	49.6 \pm 2.4	52.8 \pm 3.2
L-Fenilalanina	58.5 \pm 3.4	68.5 \pm 4.0	60.6 \pm 2.8	69.0 \pm 3.1
L-Isoleucina	62.6\pm2.9*	100.3\pm10.7*	58.0\pm3.1**	74.0\pm4.5**
L-Leucina	138.8\pm9.7*	179.4\pm13.1*	113.8\pm6.1***	156.1\pm9.6***

Diferencias significativas * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (t student).





Aminoácidos

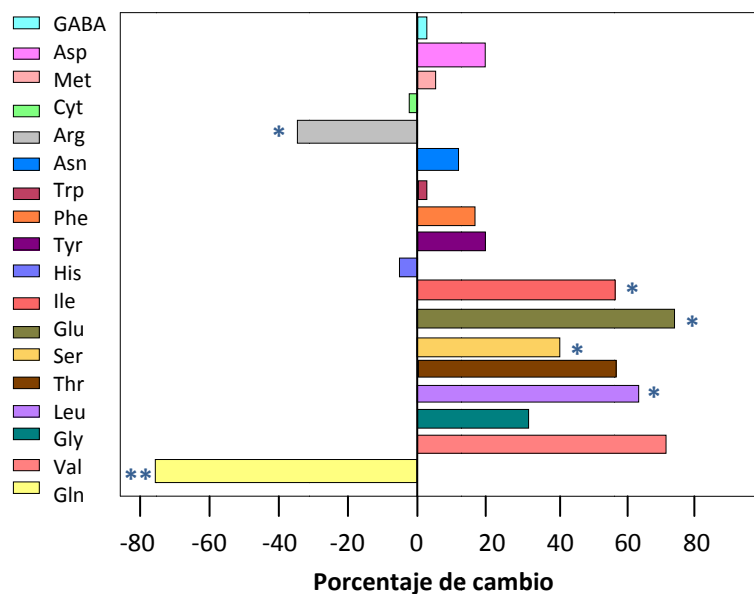


Figura 12. Porcentaje de cambio de aminoácidos en hombres adultos con DM2 con respecto a los valores medios del grupo de control. Diferencias significativas * P<0.05; **P<0.01 (t student).

Aminoácidos

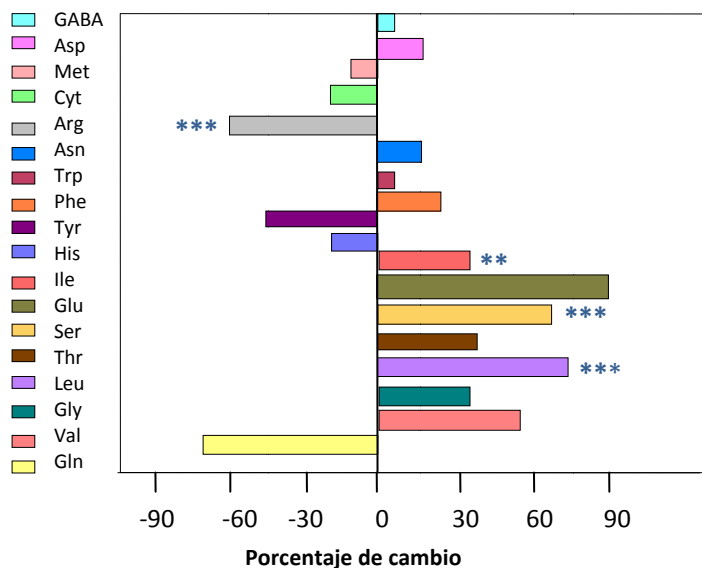


Figura 13. Porcentaje de cambio de aminoácidos en hombres adultos mayores con DM2 con respecto a los valores medios del grupo control. Diferencias significativas * P<0.01; ***P<0.001 (t student).





4.1.3. GÉNERO FEMENINO

Al igual que en el caso del grupo masculino para el grupo femenino se realizó una prueba t student para determinar diferencias significativas en las concentraciones de aminoácidos, en el caso del grupo de adultos se encontraron diferencias significativas en los aminoácidos: glutamato, asparagina, serina, fenilalanina, isoleucina y leucina, todos estos se encontraron en mayor concentración en el grupo con DM2 en comparación con el grupo control (tabla 9).

Para el grupo adulto mayor se encontraron diferencias significativas en los aminoácidos: glutamato, arginina, GABA e isoleucina, de estos aminoácidos únicamente la arginina se encontró en menor concentración en pacientes con DM2 en comparación con el grupo control (tabla número 9).

En las figuras 14 y 15 se muestra la tendencia (porcentaje de cambio) de los aminoácidos evaluados para el grupo femenino en los dos grupos de edad; adulto y adulto mayor.

Valores negativos indican una disminución en la concentración de aminoácidos plasmáticos en el grupo con DM2 con respecto al grupo control.

Valores positivos indican un aumento en la concentración de aminoácidos plasmáticos en el grupo con DM2 con respecto al grupo control.



Tabla 9. Concentración de aminoácidos en (μMol). Género femenino.

AMINOÁCIDOS	ADULTO		ADULTO MAYOR	
	CONTROL	DM2	CONTROL	DM2
L-Aspartato	3.5 \pm 1.0	11.8 \pm 4.8	2.8 \pm 0.2	14.5 \pm 4.8
L-Glutamato	47.8 \pm 6.9*	90.4 \pm 12.7*	45.6 \pm 3.4*	83.4 \pm 11.0*
L-Asparagina	33.2 \pm 1.3*	41.9 \pm 2.0*	35.3 \pm 1.4	37.6 \pm 1.9
L-Serina	79.5 \pm 3.7*	104.3 \pm 5.9*	90.4 \pm 3.9	92.5 \pm 8.7
L-Glutamina	513.1 \pm 22.0	527.2 \pm 30.5	555.4 \pm 24.4	454.5 \pm 23.5
L-Histidina	90.2 \pm 12.9	85.7 \pm 3.4	71.9 \pm 5.0	78.8 \pm 3.3
L-Glicina	219.9 \pm 16.0	264.3 \pm 26.3	250.2 \pm 13.1	288.6 \pm 67.7
L-Treonina	109.3 \pm 11.3	135.2 \pm 7.5	99.8 \pm 7.6	114.8 \pm 7.0
L-Citrulina	34.0 \pm 3.8	27.0 \pm 3.6	28.9 \pm 1.4	28.2 \pm 2.6
L-Arginina	50.8 \pm 5.3	34.6 \pm 2.5	47.0 \pm 2.5**	28.0 \pm 3.2**
GABA	1.6 \pm 0.4	2.3 \pm 0.4	1.4 \pm 0.3*	3.0 \pm 0.5*
L-Tirosina	66.0 \pm 4.7	70.9 \pm 4.0	67.1 \pm 2.9	60.6 \pm 3.8
L-Valina	180.3 \pm 8.3	224.9 \pm 11.8	188.0 \pm 7.6	204.7 \pm 10.5
L-Metionina	24.1 \pm 2.0	25.4 \pm 0.6	23.7 \pm 1.5	22.9 \pm 1.4
L-Triptófano	46.1 \pm 1.9	52.2 \pm 2.1	49.0 \pm 2.2	45.7 \pm 3.7
L-Fenilalanina	52.1 \pm 1.7*	62.8 \pm 2.1*	53.6 \pm 2.2	59.1 \pm 2.9
L-Isoleucina	48.9 \pm 2.5**	68.9 \pm 4.4**	45.6 \pm 2.0*	57.7 \pm 3.7*
L-Leucina	108.7 \pm 5.1**	146.1 \pm 7.0**	108.3 \pm 4.1	124.3 \pm 6.3

Diferencias significativas * P<0.05; ** P<0.01 (t student).





Aminoácidos

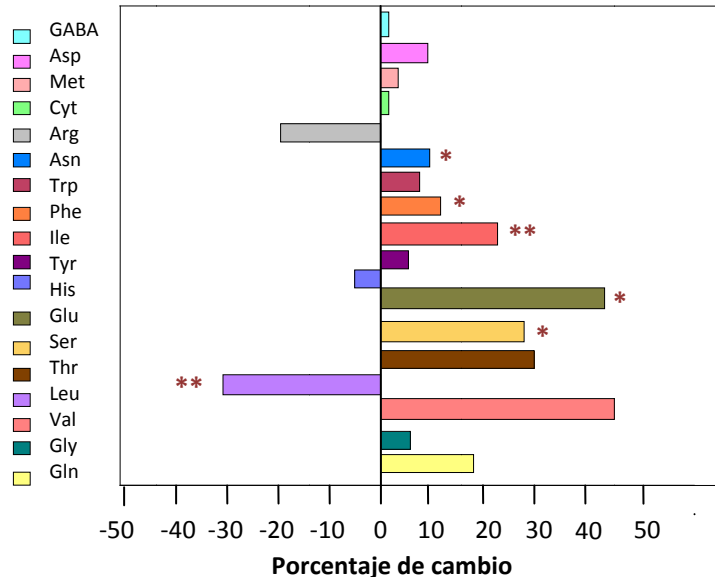


Figura 14. Porcentaje de cambio de aminoácidos en mujeres adultas con DM2 con respecto a los valores medios del grupo de control. Diferencias significativas * P<0.05; **P<0.01 (t student)

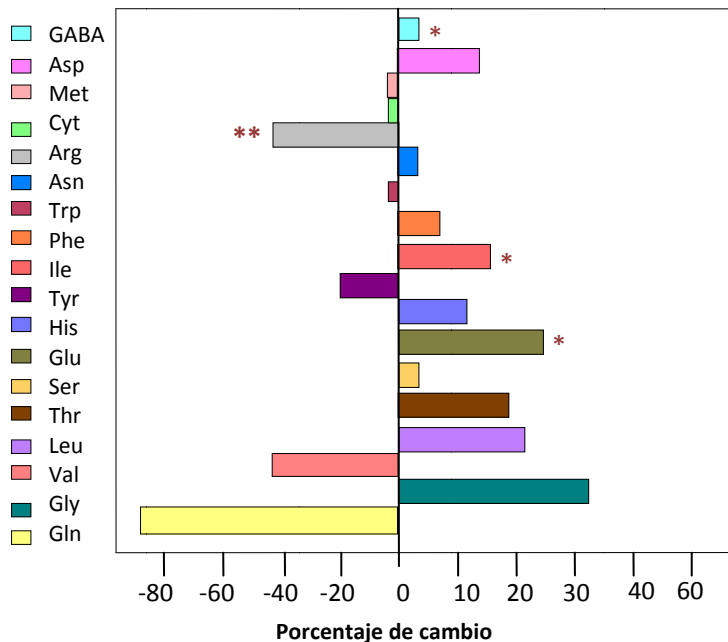


Figura 15. Porcentaje de cambio de aminoácidos en mujeres adultas mayores con DM2 con respecto a los valores medios del grupo de control. Diferencias significativas * P<0.05; **P<0.01 (t student).





4.1.4. GÉNERO FEMENINO VS GÉNERO MASCULINO

Se realizó un análisis entre géneros aplicando como prueba estadística un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Al comparar al grupo adulto con DM2 masculino con el grupo adulto con DM2 femenino se encontraron diferencias significativas en los aminoácidos; isoleucina y leucina, como se muestra en la tabla número 10. En el grupo adulto mayor se encontró la misma tendencia de estos aminoácidos, los cuales se encuentran en mayor concentración en hombres que en mujeres.

Las figuras 16 y 17 representan la tendencia de los aminoácidos para el grupo masculino con DM2 con respecto al grupo femenino con DM2 para los dos rangos de edad evaluados; adultos (figura 16) y adultos mayores (figura 17).

Valores negativos indican una disminución en la concentración de aminoácidos plasmáticos en el grupo masculino DM2 con respecto al grupo femenino con DM2.

Valores positivos indican un aumento en la concentración de aminoácidos plasmáticos en el grupo masculino con DM2 con respecto al grupo femenino con DM2.



Tabla 10. Concentración de aminoácidos en (μMol). Diferencias por género.

AMINOÁCIDOS	ADULTO DIABETICO		ADULTO MAYOR DIABETICO	
	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO
L-Aspartato	14.6 \pm 5.8	11.8 \pm 4.8	11.4 \pm 3.0	14.4 \pm 4.77
L-Glutamato	107.4 \pm 16.5	90.3 \pm 12.7	108.8 \pm 19.3	83.4 \pm 10.9
L-Asparagina	45.2 \pm 3.3	41.8 \pm 2.0	40.4 \pm 2.5	37.5 \pm 1.8
L-Serina	117.2 \pm 9.1	104.3 \pm 5.9	112.4 \pm 6.2	92.4 \pm 8.6
L-Glutamina	475.6 \pm 28.6	527.1 \pm 30.5	473.3 \pm 34.3	454.5 \pm 23.5
L-Histidina	86.2 \pm 4.0	85.6 \pm 3.4	87.5 \pm 4.0	78.7 \pm 3.2
L-Glicina	236.5 \pm 17.8	264.3 \pm 26.2	254.0 \pm 28.5	288.5 \pm 67.7
L-Treonina	144.8 \pm 14.5	135.2 \pm 7.4	126.3 \pm 6.3	114.7 \pm 6.9
L-Citrulina	32.6 \pm 5.4	27.0 \pm 3.5	29.8 \pm 2.5	28.2 \pm 2.6
L-Arginina	33.7 \pm 5.6	34.5 \pm 2.5	28.9 \pm 2.8	27.9 \pm 3.2
GABA	2.5 \pm 0.1	2.2 \pm 0.4	2.4 \pm 0.3	2.9 \pm 0.4
L-Tirosina	73.1 \pm 5.5	70.8 \pm 4.0	61.5 \pm 3.5	60.5 \pm 3.7
L-Valina	275.4 \pm 25.0	224.9 \pm 11.7	217.5 \pm 10.5	204.7 \pm 10.4
L-Metionina	30.0 \pm 2.4	25.3 \pm 0.5	26.4 \pm 1.4	22.9 \pm 1.4
L-Triptófano	55.0 \pm 4.0	52.2 \pm 2.0	52.8 \pm 3.2	45.6 \pm 3.7
L-Fenilalanina	68.5 \pm 4.0	62.8 \pm 2.1	69.0 \pm 3.0	59.0 \pm 2.8
L-Isoleucina	100.2 \pm 10.7*	68.9 \pm 4.3*	74.0 \pm 4.4*	57.7 \pm 3.7*
L-Leucina	179.4 \pm 13.1*	146.0 \pm 6.9*	156.0 \pm 9.5*	124.3 \pm 6.2*

Diferencias significativas * $P < 0.05$ (ANOVA).



Aminoácidos

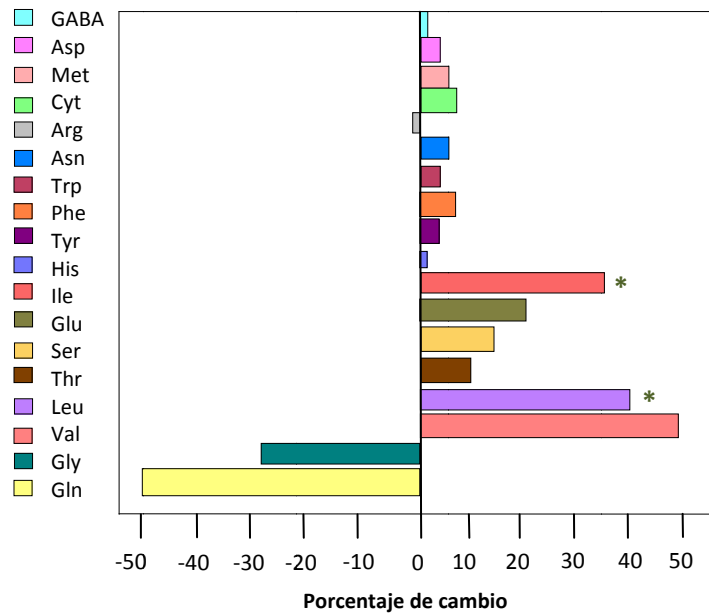


Figura 16. Porcentaje de cambio de aminoácidos en hombres adultos con DM2 con respecto a los valores medios del grupo femenino adulto con DM2. Diferencias significativas * P<0.05 (ANOVA).

Aminoácidos

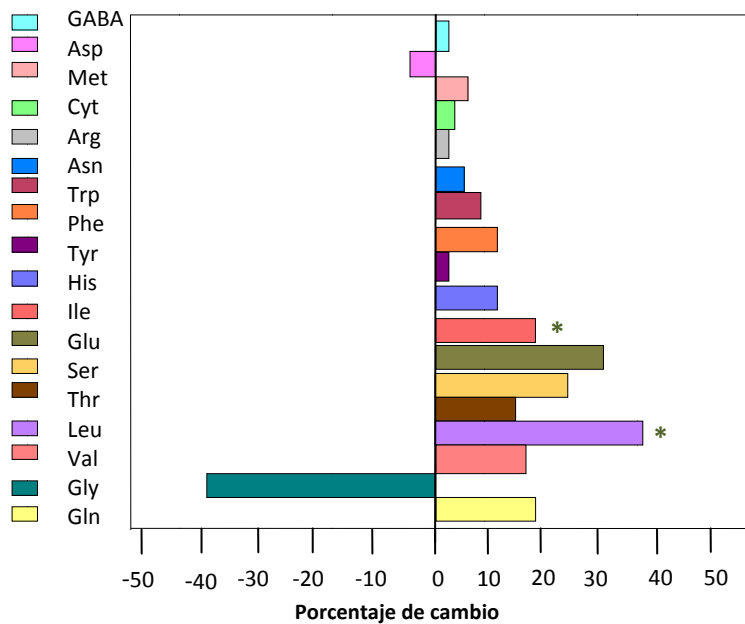


Figura 17. Porcentaje de cambio de aminoácidos en hombres adultos mayores con DM2 con respecto a los valores medios del grupo femenino adulto mayor con DM2. Diferencias significativas * P<0.05 (ANOVA).

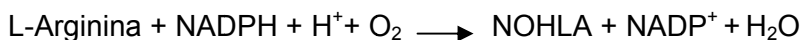




4.2. CONCENTRACIÓN DE NITRITOS

La arginina es un aminoácido que puede formar citrulina y óxido nítrico, mediante la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). El óxido nítrico puede metabolizarse a nitritos ocasionando un estrés oxidativo en el organismo.

La reacción en la cual se forma citrulina y óxido nítrico se muestra a continuación:



En la figura 18 se muestra el mecanismo de la reacción mediada por la NOS.

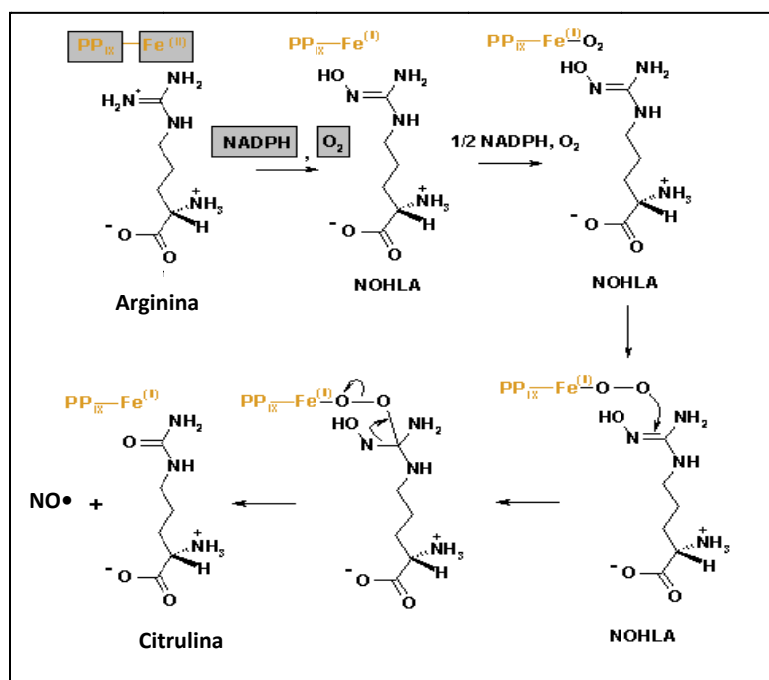


Figura 18. Mecanismo de reacción de la óxido nítrico sintasa (NOS)
La formación de citrulina a partir de L-Arginina ocurre por la oxidación del nitrógeno del grupo guanidina de la arginina. Mediante una reacción de monooxigenación, se produce N^ω-hidroxi-L-arginina (NOHLA) como intermediario.





Se evaluaron los niveles de nitritos en plasma de la población masculina y femenina (adultos mayores) encontrando una mayor concentración de nitritos en los pacientes con DM2 tanto en mujeres como en hombres en comparación con los controles, sin embargo estas diferencias fueron significativas únicamente en el grupo femenino, estos resultados se observan en la tabla número 11.

Tabla 11. Concentración de nitritos en plasma.

PARÁMETRO	GÉNERO FEMENINO		GÉNERO MASCULINO	
	CONTROL	DM 2	CONTROL	DM 2
μM de NO_2 /mg de proteína	$1.3 \pm 0.3^*$	$2.9 \pm 0.7^*$	2.071 ± 0.4	2.9 ± 0.3

Diferencias significativas * $P < 0.05$ t student





V DISCUSIÓN

- Glucosa

Niveles normales en plasma ⁴³
70-110 mg/dL

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo; la insulina facilita la entrada de glucosa en las células.

Los valores obtenidos indican que los niveles de glucosa en sangre en la población con DM2 se encuentran elevados, posiblemente debido a un inadecuado tratamiento así como de su alimentación.

- Ácido úrico

Niveles normales en plasma ⁴⁴
Hombres: 3.6-7.7 mg/dL
Mujeres: 2.5-6.8 mg/dL

El ácido úrico y sus sales son el producto final del metabolismo de las purinas. Niveles elevados de ácido úrico indican una de patología renal y generalmente se asocia con la enfermedad de la gota.

Los valores encontrados en la población en estudio fueron normales, indicando que no existe daño renal.

- Creatinina

Niveles normales en plasma ⁴⁵
Hombres: 0.7-1.4 mg/dl
Mujeres: 0.6-1.4 mg/dL

La creatinina es un compuesto formado a partir de la degradación de componentes de los músculos, puede ser transformada en ATP, que es una fuente de alta energía para las células. La creatinina es excretada por los riñones, por lo que su medición puede dar información acerca de la función renal.



En este caso los valores obtenidos se encontraron entre los valores normales indicando un adecuado funcionamiento renal de los individuos en estudio.

- Colesterol

Niveles normales en plasma ⁴³
140-200 mg/dL

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. El incremento del nivel de colesterol en el organismo es uno de los principales factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares. Los valores de los niveles de colesterol en estudio se encontraron dentro de los niveles normales.

- Triglicéridos

Niveles normales en plasma ⁴³
Hombres: 40-160 mg/dL
Mujeres: 35-135 mg/dL

Los triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre. Una dieta alta en grasas saturadas o carbohidratos pueden elevar los niveles de triglicéridos.

Los resultados encontrados muestran una elevación en los niveles de triglicéridos en el grupo; masculino adulto con DM2 y en el grupo femenino adulto mayor con DM2.





- Lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés high density lipoprotein)

Niveles normales en plasma ⁴³
Hombres menos de 55 mg/dL
Mujeres: menos de 65 mg/dL

Las partículas de HDL transportan el colesterol de los tejidos del cuerpo al hígado. HDL puede eliminar el colesterol de las arterias y llevarlo de nuevo al hígado para su excreción, HDL se conoce como "colesterol bueno" se cree que niveles altos pueden disminuir el riesgo de enfermedad cardíaca. En el grupo masculino adulto fue en donde se encontró elevado este analito.

- Hemoglobina glicada (Hb) ⁴⁴

Niveles normales en plasma
5-8%

Esta prueba de laboratorio es muy utilizada en individuos con diabetes para saber si el control de la enfermedad en el paciente ha sido correcto durante los últimos dos o tres meses.

La glucosa se adhiere a algunas proteínas, siendo una de ellas la hemoglobina, la hemoglobina es modificada debido a que en su proceso de formación se le une una molécula de glucosa. Mientras más glucosa se encuentre en la sangre, más glucosa se pegará a la hemoglobina que está en formación.

Los valores reportados indican que el control en los niveles de glucosa en sangre no ha sido el adecuado excepto para el grupo femenino adulto mayor con DM2.





Los resultados obtenidos en la cuantificación de los aminoácidos indican que los niveles de aminoácidos se encuentran en diferentes concentraciones dependiendo de la edad, género y estado de salud en general.

De los 18 aminoácidos evaluados en este trabajo se encontraron diferencias significativas en 9 aminoácidos con respecto a los grupos control.

Estas diferencias se observan de la figura 12 a la figura 17 en donde se muestra el porcentaje de cambio de las concentraciones de los aminoácidos, valores positivos indican un incremento en la concentración de los aminoácidos, valores negativos indican una disminución de las concentraciones de aminoácidos plasmáticos.

Para el género masculino con edad entre 40- 59 años (adultos), los aminoácidos con diferencia significativa respecto al grupo control fueron: glutamato, serina, glutamina, arginina, leucina e isoleucina (figura 12). Para los adultos mayores se encontraron diferencias significativas en los aminoácidos; serina, arginina, leucina e isoleucina (figura 13). Los resultados en general muestran que la tendencia de los aminoácidos incluyendo los que no mostraron diferencias significativas no es la misma en los dos grupos de edad.

En el caso de la población femenina en adultos se encontraron diferencias significativas en los aminoácidos; glutamato, asparagina, serina, fenilalanina, isoleucina y leucina (figura 14) pero estas diferencias no se observaron de la misma forma en los dos rangos de edad evaluados (adultos y adultos mayores). En adultos mayores se encontraron diferencias significativas en glutamato, arginina, GABA e isoleucina (figura 15). La tendencia del resto de los aminoácidos que no presentaron diferencias significativas también se muestran diferentes para los dos rangos de edad, igual que en el caso del género masculino.





Al realizar la comparación entre géneros en individuos diabéticos, únicamente se encontraron diferencias en los aminoácidos: leucina e isoleucina, tanto en adultos (figura 16) como en adultos mayores (figura 17) en los cuales estos aminoácidos se encontraron en mayor concentración en hombres que en mujeres. Es importante mencionar que en todos los análisis realizados estos dos aminoácidos presentaron diferencias significativas, lo que posiblemente sugiere que se ven mayormente afectados cuando se padece de DM2.

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración aminoácidos posiblemente pueden ser causados no solo por la presencia de DM2 sino también por diversos factores como por ejemplo; la edad, factores hormonales que pueden afectar la concentración de los aminoácidos en el organismo.^{46, 47}

De los 9 aminoácidos que mostraron diferencias significativas, 6 se consideran glucogénicos; arginina, asparagina, serina, fenilalanina, glutamato y glutamina, esto quiere decir que su catabolismo puede entrar a la ruta metabólica del ciclo de Krebs y sintetizar como producto final glucosa. El ciclo de Krebs o de ácidos tricarbónicos es una ruta metabólica encargada de la oxidación de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos hasta producir CO₂ y energía.

La isoleucina y la leucina son considerados como cetogénicos porque pueden metabolizarse y formar cuerpos cetónicos. Sin embargo la isoleucina se considera glucogénico y cetogénico.⁴⁸

De estos 9 aminoácidos con excepción de glutamina y arginina todos se encontraron en mayor concentración, posiblemente indicando un aumento en el catabolismo de los aminoácidos.

Respecto a la arginina entre otras funciones, sintetiza citrulina y óxido nítrico a través de una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa, el óxido nítrico se metaboliza a nitritos, un incremento de estos en el organismo provocan un estrés oxidativo en el organismo.⁴²





Como se menciono anteriormente la arginina se encontró en menor concentración en los grupos con DM2 en comparación con los grupos control, en el caso de la citrulina sus valores variaron en los distintos grupos evaluados.

En el género masculino en adultos los niveles en la concentración de citrulina se encontraron prácticamente iguales: 32.6 ± 3.0 y 32.7 ± 5.5 para el grupo control y el grupo con DM2 respectivamente.

Para el grupo adulto mayor los valores se encontraron en menor concentración en el grupo con DM2 (tabla 8).

En el caso de las mujeres (adulto); se encontró en mayor concentración en el grupo con DM2, en adultos mayores se encontró casi en la misma concentración; 28.9 ± 1.4 y 28.2 ± 2.6 para el grupo control y el grupo con DM2 respectivamente (tabla 8).

Al comparar los grupos diabéticos (masculino vs femenino) se encontró en menor concentración en el grupo femenino, como se muestra en la tabla número 9.

Relacionando los valores de citrulina con los de arginina, los controles muestran que la arginina tiende a presentarse en niveles más altos que la citrulina, sin embargo en los grupos con DM2 los valores de estos 2 aminoácidos son muy parecidos (tabla 8, 9 y 10).

Estos resultados son posiblemente debido a que al formarse la citrulina a partir de la arginina, los niveles de arginina influyen en la cantidad de citrulina sintetizada, sin embargo es posible que existan otros factores que influyan en la síntesis de citrulina. Por lo que para poder determinar adecuadamente la manera en la que la arginina puede afectar la síntesis de citrulina (además de otros metabolitos) es necesario tomar en cuenta múltiples factores como lo son; sistemas de transporte, enzimas que intervienen en la síntesis (en este caso la enzima óxido nítrico sintasa), otras vías que participan en la síntesis citrulina y que pueden estar alteradas por los niveles de glucosa.⁴²





Nutricionalmente los aminoácidos se clasifican en esenciales y no esenciales, los aminoácidos esenciales son aquellos que el organismo no puede sintetizar, por lo que deben ser administrados mediante la dieta. Los aminoácidos no esenciales son los que si pueden ser sintetizados por el organismo (figura 6). Los resultados obtenidos muestran que los aminoácidos no esenciales se encuentran más alterados que los esenciales.

Entre los aminoácidos no esenciales se encuentran; arginina, asparagina, serina, glutamato, glutamina. Y de los aminoácidos esenciales, se encontraron; fenilalanina, leucina e isoleucina.

La arginina participa en la estimulación de la secreción de insulina mediante el incremento en la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular por la despolarización de la membrana plasmática de las células.

Aunque la arginina es considerado como el aminoácido más importante en la estimulación de la secreción de insulina, su catabolismo puede dar como resultado la formación de oxido nítrico que puede transformarse en nitritos y provocar un estrés oxidativo en el organismo el cual puede tener un fuerte impacto en la secreción de la insulina al dañar el funcionamiento de las células β pancreáticas.

La serina, participa en el metabolismo de los lípidos, interviene en la desintoxicación del organismo. También participa en la secreción de insulina pero en cantidades mínimas, estimula la secreción de glucagón, sin embargo no se conocen los mecanismos por los cuales realiza estas funciones.⁴⁶

La glutamina es importante para la estimulación, mantenimiento y funcionamiento de diversos órganos como el riñón, intestino, hígado, corazón, células β pancreáticas, neuronas, linfocitos, macrófagos y neutrófilos, es precursor de proteínas, también participa en la síntesis de glutatión y ácidos nucleicos.⁵





A pesar de que la glutamina participa en el correcto funcionamiento de las células β pancreáticas por sí sola no estimula o potencia la secreción de insulina sin embargo, si se administra junto con leucina logra inducir la secreción de insulina.

Como se mencionó anteriormente la leucina interviene en la liberación de la insulina, incrementa la producción de ATP que provoca la despolarización de la membrana, esto aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular obteniendo como resultado final la liberación de insulina, también participa en la formación y reparación del tejido muscular.

Otro mecanismo por el cual la leucina interviene en la liberación de insulina es activando la vía mTOR.⁴⁶ No se sabe como activa el complejo mTOR pero es probable que lo realice mediante la estimulación de una cinasa o por la inhibición de la fosfatasa que actúan sobre mTOR. La activación de mTOR/S6K provoca la fosforilación (de residuos de serina) del receptor de insulina provocando efectos en los primeros pasos de la señalización de la insulina.

Se cree que mTOR integra la información de detección de aminoácidos y la mediada por la insulina a través de efectores como p70S6-cinasa. Estudios sugieren que la regulación de mTOR es sensible a la variación de la concentración intracelular de aminoácidos, funcionando como un sensor de energía.^{5, 49}

Otros aminoácidos que también han demostrado participar en la secreción de insulina son; ácido aspártico, glicina, histidina, triptófano y valina, pero el mecanismo, así como las concentraciones en las cuales se observa dicha respuesta no son claras.

Los aminoácidos son de gran importancia por el gran número de funciones que realizan en el organismo, desde ser las moléculas fundamentales de las proteínas, participar en diversas vías metabólicas, como moléculas para la síntesis de otros aminoácidos entre otras funciones.





La diferencia de los valores de los aminoácidos encontrados se puede deber al papel fisiológico de los aminoácidos los cuales pueden variar bajo diversas condiciones. Por ejemplo, la madurez y el envejecimiento pueden influir en la concentración de los aminoácidos en el organismo, así como la potencia de los aminoácidos para provocar la secreción de hormonas como por ejemplo la insulina.⁴⁷

La dieta también puede influir en la secreción de hormonas y en el metabolismo. Se ha demostrado que la ingestión de proteína da como resultado un sinergismo con la actividad de la insulina, disminuyendo los niveles de glucosa en plasma en comparación con glucosa ingerida sin proteínas. Al administrar diferentes fuentes de proteínas las respuestas son diferentes, lo que sugiere que una diferencia en la composición de aminoácidos de las proteínas puede ser responsable en la secreción de insulina.⁴⁶

Los resultados obtenidos muestran que en individuos con DM2, los aminoácidos no esenciales son los más afectados debido a que estos no pueden ser ingeridos en los alimentos y dependen de que el metabolismo anabólico se encuentre trabajando adecuadamente y así proveer al organismo de los aminoácidos necesarios para llevar a cabo de manera adecuada todas sus funciones.

En cuanto a los niveles de nitritos en plasma, estos se encontraron elevados en los individuos con DM2 en comparación con los grupos control mostrando un posible incremento de estrés oxidativo (EOx) en el organismo (tabla 11). Debido a que los nitritos son radicales libres, pueden afectar severamente al organismo, un radical libre es una especie altamente inestable y reactiva que precisa de obtener el átomo que le falta de las moléculas vecinas, si esto sucede, se puede afectar la fisiología de las células al oxidar lípidos de membrana, carbohidratos, proteínas e incluso al ADN.⁴²





Estudios han revelado que la hiperglucemia puede desencadenar procesos bioquímicos dañinos para el organismo, como es el estrés oxidativo (EOx), proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas.

El EOx se asocia con el mecanismo fisiopatológico de más de 100 enfermedades, destacando a la aterosclerosis, cáncer, artritis reumatoide, Alzheimer y DM. Los principales radicales libres que se originan son los derivados de la respiración aerobia denominados especies reactivas de oxígeno (EROs).⁴²

En sujetos diabéticos se ha encontrado una disminución en la actividad de los antioxidantes, mientras se da un incremento de los productos de oxidación.⁴¹ Esto se debe a que un exceso de glucosa circulante origina la activación de varias vías metabólicas no muy usuales en el organismo, provocando la generación de otros metabolitos entre los cuales se encuentran los RL de oxígeno.⁴²

Algunas de las vías implicadas en el EOx son la ruta del sorbitol, glucosilación no enzimática de proteínas y modificación de la actividad de la protein-quinasa C.





VI CONCLUSIONES

Se separaron y cuantificaron 18 aminoácidos por HPLC en fase reversa en plasma sanguíneo en individuos control y con DM2, encontrando diferencias significativas en los valores de 9 aminoácidos; arginina, asparagina, serina, fenilalanina, glutamato, glutamina, leucina, isoleucina y GABA.

Se puede concluir que los valores de los aminoácidos en el organismo dependen de la edad, género y en general del estado metabólico de los individuos.

Durante la digestión, las proteínas de la dieta son hidrolizadas hasta sus aminoácidos constituyentes, estos son absorbidos en el intestino y transportados por la sangre a los tejidos. A diferencia de carbohidratos y grasas, los aminoácidos no se almacenan en el organismo, estos se transforman en intermediarios metabólicos como son el piruvato, oxalacetato y α -cetoglutarato, y de esta manera participan como precursores de glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, es decir, actúan como combustible y precursores metabólicos. Debido a esto es importante que los aminoácidos se encuentren en el organismo en concentraciones adecuadas para poder realizar eficientemente su función.

La mayoría de los aminoácidos estimulan la secreción de insulina, sin embargo se ha demostrado que son mejores estimuladores si se administran en combinación con glucosa o combinando varios aminoácidos. Sin embargo la mayoría de los mecanismos por los cuales logran realizar esta función se basan únicamente en especulaciones, por lo que es importante realizar estudios que ayuden a determinar estos mecanismos de acción. Con una mejor comprensión de estas funciones, puede ser posible la utilización de los aminoácidos, como suplementos terapéuticos en varias condiciones clínicas y no únicamente en la diabetes mellitus, sin embargo es importante tener en cuenta que podrían aparecer efectos secundarios no deseados como alteración en la función renal.⁴⁶



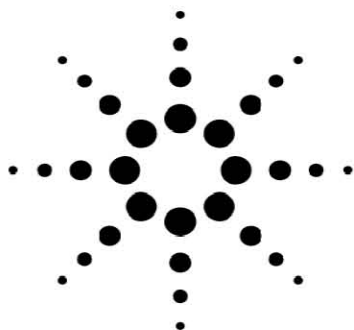
El estrés oxidativo se asocia con los niveles bajos de insulina en los pacientes diabéticos, debido a que las células β del páncreas pueden ser dañadas por los radicales libres, una vez presente la enfermedad es muy posible que empeore la situación del individuo diabético, debido a que disminuye la secreción de insulina en el páncreas por interferencia de los RL sobre el proceso normal de producción y secreción de insulina.

Un posible mecanismo unificador consiste en que la hiperglucemia propicia la producción de especies reactivas de oxígeno o superóxido en las mitocondrias; estos compuestos pueden activar todas las vías descritas con anterioridad. Aunque la hiperglucemia actúa como factor desencadenante inicial de las complicaciones de la diabetes, aún no se sabe si entran en operación los mismos procesos fisiopatológicos en todas las complicaciones, o si predominan vías determinadas en ciertos órganos.



APÉNDICE

Apéndice 1. Método de referencia para la determinación de aminoácidos.



Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids

Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC

John W. Henderson, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer, and Cliff Woodward

An ideal, quantitative amino acid analysis combines speed and sensitivity with reliability of both the derivatization reaction and the analytical technique. These goals are achieved with automated, online derivatization using o-phthalaldehyde (OPA) for primary amino acids and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) for secondary amino acids; the automated derivatization is then integrated with rugged HPLC analysis. The complete procedure is rapid, accurate, sensitive, and reproducible using the Agilent 1100 HPLC.

Combining OPA and FMOC chemistries enables fast pre-column derivatization of amino acids (AA) for chromatographic analysis. The reaction mixture is buffered at a pH of 10.2, which allows direct derivatization of acid hydrolyzed protein/peptide samples. The primary AA's are reacted first with OPA using 3-mercaptopropionic acid (3-MPA). The secondary AA's do not react with the OPA; but are then derivatized using FMOC. The incorporation of 3-MPA into the indoles decreases their hydrophobicity, and as a result, the OPA-derivatives elute chromatographically before the FMOC derivatives. Excess FMOC and its degradation products elute after the last of the secondary AA's and do not interfere with the analysis. The derivatization process is fast

and is easily automated using the Agilent 1313A autosampler. Because of the advantageous reaction speeds, both derivatizations are complete at room temperature. The automated procedure provides a high degree of reproducibility. Total analysis from injection to injection can be achieved in as little as 14 min (10-min analysis time) on the 75-mm column. On the 150-cm column total run time is 26 min (16-min analysis time). Both analyses provide high sample throughput.

SEPARATION OPTIONS

The Zorbax Eclipse-AAA column contains batch-qualified reversed-phase material. When used according to the protocol described in this *Technical Note*, the column enables the user to separate the

amino acids commonly found in protein/peptide hydrolysates.

The A and B mobile-phase components are easy to prepare, and the gradient consists of linear segments (refer to *Experimental Conditions, Mobile Phase* section, for details). This combination contributes to a rugged protocol that can be accomplished on the Agilent 1100 HPLC using either binary or quaternary solvent-delivery systems. The chromatogram in Figure 1 illustrates typical routine sensitivity in high-throughput applications that can be obtained on the Agilent 1100 HPLC binary system using the 1100 Diode Array Detector (DAD). A single run can be completed in 14 minutes (including re-equilibration) with adequate resolution. Separation conditions are listed in

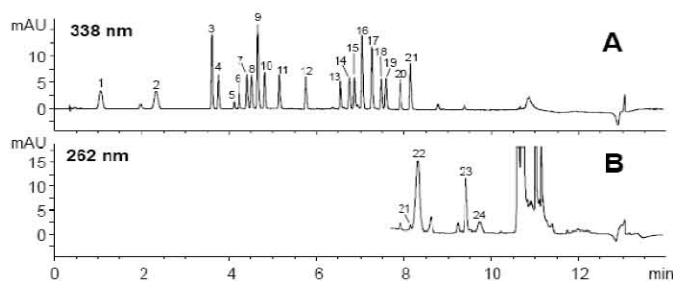


Figure 1: Routine Analysis, High-Throughput Separation of 24 Amino Acids Using the Eclipse-AAA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 75 mm, 3.5 μ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A, 338 nm (OPA amino acids), B, 262 nm (FMOC-amino acids).



the *Experimental Conditions* section. The primary amino acids (OPA-derivatized) shown in Figure 1A, are monitored at 338 nm while the secondary amino acids (FMOC-derivatized) shown in Figure 1B, are monitored at 262 nm. The amount injected was 125 pmoles of each amino acid, in 0.5 μ L.

Table 1. Amino Acid Elution Order Using Eclipse-AAA Protocol

Peak No.	Amino Acid	3-Letter Code
1	Aspartate	ASP
2	Glutamate	GLU
3	Asparagine	ASN
4	Serine	SER
5	Glutamine	GLN
6	Histidine	HIS
7	Glycine	GLY
8	Threonine	THR
9	Citrulline	CIT
10	Arginine	ARG
11	Alanine	ALA
12	Tyrosine	TYR
13	Cystine	CY2
14	Valine	VAL
15	Methionine	MET
16	Norvaline	NVA
17	Tryptophan	TRP
18	Phenylalanine	PHE
19	Isoleucine	ILE
20	Leucine	LEU
21	Lysine	LYS
22	Hydroxyproline	HYP
23	Sarcosine	SAR
24	Proline	PRO

When more resolution is desired than is available from the high-throughput separation on a 75-mm column (Fig. 1), a 150-mm column length should be used. Figure 2 shows a typical routine sensitivity, high-resolution separation obtained from two different Zorbax Eclipse-AAA 150-mm length columns – one with 3.5 μ m particles and the other with 5 μ m particles. The chromatograms show the 338 nm UV signal that detects the OPA-derivatized primary amino acids. These separations are quite similar in appearance, but the chromatogram for the 3.5- μ m column demon-

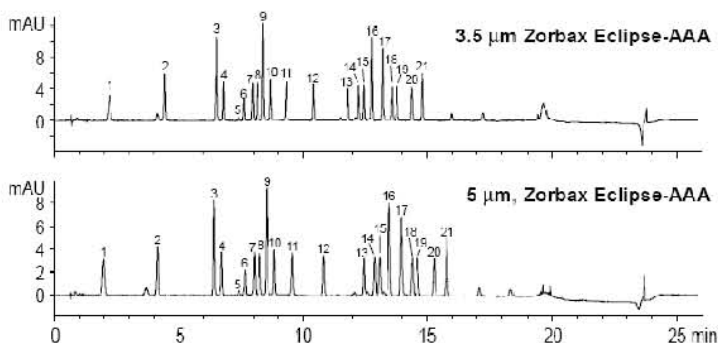


Figure 2: High-Resolution Analysis of 21 Amino Acids: on the 5 μ m and 3.5 μ m Zorbax Eclipse-AAA Column. Column dimensions are 4.6 x 150 mm. See Table 1 for peak identification. Detection: 338 nm (OPA amino acids).

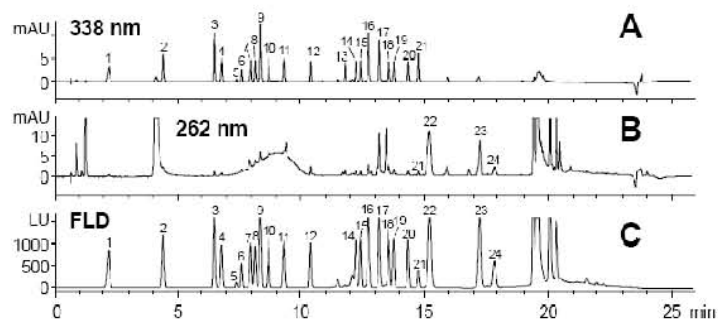


Figure 3: High Sensitivity, High-Resolution Analysis of Amino Acids Using Different Detection Modes and the Zorbax Eclipse-AAA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 150 mm, 3.5 μ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A. UV 338 nm (OPA amino acids), B. UV 262 nm (FMOC-amino acids), C. fluorescence (see *Experimental Conditions*).

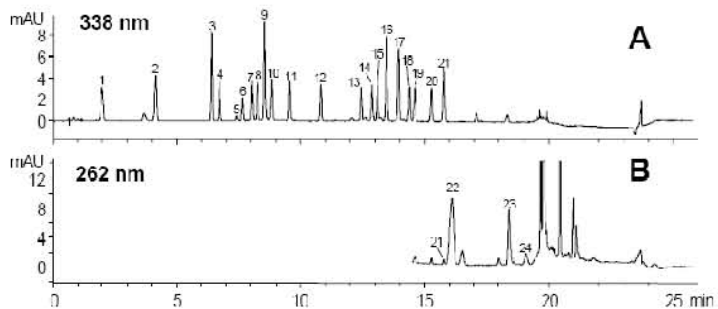


Figure 4: Routine Analysis, High Resolution of 24 Amino Acids Using the Eclipse-AAA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 150 mm, 5 μ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A. UV 338 nm (OPA amino acids), B. UV 262 nm (FMOC-amino acids).





strates higher resolution resulting from higher efficiency. Backpressure on the column containing the smaller, 3.5 μm , particles is 240-300 bar (3530-4410 psi), while the backpressure of the column having 5 μm particles is 160-210 bar (2350-3090 psi). Thus, if only primary amino acids are of interest and the 15-cm column length is used, the larger 5- μm packing is a better choice because of less system backpressure.

The value of the 15-cm column containing 3.5- μm particles, over its 5- μm counterpart, is clearly illustrated by comparing Figures 3 and 4. Figure 3A shows separation of the primary amino acids, monitored at 338 nm; Figure 3B shows the separation monitored at 262 nm; and Figure 3C shows the analysis using fluorescence detection. Note the resolution between peaks #21 (lysine) and #22 (hydroxyproline) in Figures 3 and 4. The increase in resolution between these peaks, when using the longer column with smaller particles (150mm, 3.5 μm), provides a longer time-window that facilitates wavelength switching of the DAD or FLD between peaks #21 and #22.

When monitoring at 262 nm (Fig. 3B), a small baseline "hump" elutes between 7 and 10 minutes due to derivatization byproducts. Since only the primary AA's are monitored (338 nm) during this time, the "hump" has no impact on their detection or resolution. It is best to monitor at two wavelengths for detection of secondary amino acids such as hydroxyproline. If this is not desirable, wavelength switching can be used.

The specific time to switch fluorescence (or UV) wavelengths may differ due to minor variations in temperature, mobile phase, etc. In Figure 3C the FLD signal monitored at 450 nm (Ex = 340 nm), is programmed to change to 305 nm

(Ex = 266 nm) after peak #21 (lysine) elutes but before peak #22 (hydroxyproline) elutes. In this case, the switch was programmed to occur at exactly 15 minutes. For specific details, see the *Experimental Conditions Section, Detection Settings*. After Peak #24 (proline) elutes, the gradient increases to 100% channel B to elute reaction byproducts from the column. After the step gradient up to 100% B for 3.7 minutes, a programmed return to the starting conditions equilibrates the column for the next injection. Also note in the fluorescence chromatogram, that Peak #13 (cystine) does not fluoresce under these conditions and is not detected.

Lysine-Hydroxyproline Separation and Wavelength Switching

Analysis of lysine and hydroxyproline has a major impact on the choice of detection parameters and column configuration, as well as the resulting runtime. Amino acids eluting prior to hydroxyproline (up to and including lysine) are derivatized with OPA and are detected at 338 nm. Hydroxyproline elutes immediately after lysine and is the first FMOC-derivatized amino acid to elute; detection must be at 262nm. The simplest solution is continuous collection of 338 nm and 262 nm data in two separate signals using the Agilent 1100 DAD

or MWD (multiwavelength detector).

If the DAD and MWD are not available, the wavelength collected in a single channel can be switched under carefully chosen conditions, for detection of both OPA and FMOC-derivatized amino acids. Collection of data in a single channel may be necessary, for instance, when using the Agilent 1100 VWD (variable wavelength detector). Increased resolution between lysine and hydroxyproline is possible when using more-complex gradient-profiles. Check on the web for additional information at www.agilent.com/chem in the "Technical Support" / "User Contributed Software".

When hydroxyproline is not of interest in the sample (e.g., in analysis of protein hydrolysates), it is possible to use any of the column configurations and switch wavelength at a time between lysine elution and elution of the first FMOC-amino acid (sarcosine or proline). In this scenario, the 4.6 x 75 mm column size is adequate and has the advantage of half the analysis time.

COMPARISON WITH AMINOQUANT METHOD ON THE HP1090 HPLC

Figure 5A shows a chromatogram

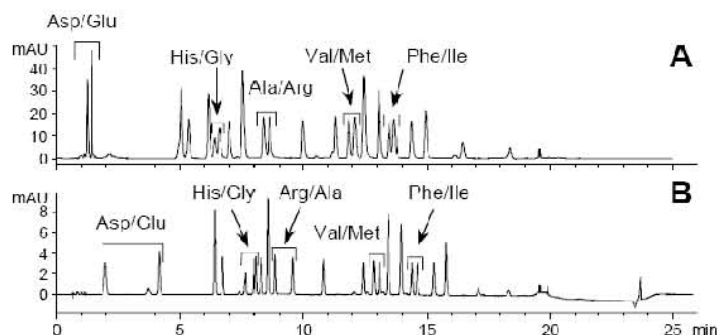


Figure 5: Comparison of Amino-Acid Analyses. A) AminoQuant Method on the HP 1090 HPLC with a Hypersil AA Column. B) Zorbax Eclipse-AAA Column (4.6 x 150 mm, 5 μm) on the Agilent 1100 HPLC.





from the original AminoQuant method (Application Notes, HP Pub. No. 5954-6257) on the HP1090 HPLC using the specified mobile phase, column and flow rate. There are five critical pairs (asp/glu, his/gly, ala/arg, val/met and phe/ile) in this separation. The asp/glu pair elutes very closely to the void volume.

Figure 5B shows a chromatogram obtained using the Zorbax Eclipse-AAA column. The resolution of all of the critical pairs is improved, especially the first pair, asp/glu, which now has increased retention and is moved significantly away from the column's void volume. Note also, that arginine elutes before alanine when using the Eclipse-AAA column, compared to the original AminoQuant method on the same HP 1090 instrument.

REPRODUCIBILITY

Table 2 shows the results from replicate injections (n=6) of the amino acid reaction mixture separated using a Zorbax Eclipse-AAA column (4.6 x 150 mm, 3.5 µm). Each run represents an individual derivatization and its chromatographic separation. Retention time reproducibility is quite good with an average % relative standard deviation (%rsd) of 0.18%. The reproducibility of the derivatization, as represented by the peak area has an average %rsd of 2.0. These data are comparable to those published for the original AminoQuant method on the HP 1090 instrument (0.23 % and 2.3 % respectively (*LC/GC International*, Volume 5, Number 2, Feb 1992, pp. 44-49).

LINEARITY AND SENSITIVITY

Linearity for the Eclipse-AAA protocol is demonstrated for the range of 4.5 pmoles to 450 pmoles, using amino acid standards (0.5µl sample). Figure 6 shows calibration curves for several amino acids

using DAD or FLD detection. The correlation coefficient for all 24 amino acids is between 0.99900 and 1.00000 using either the DAD or FLD detector for calibration.

Detection of derivatized amino acids at two low levels, 5 pmoles and 50 pmoles, is shown in Figures 7 and 8 for the DAD and FLD, respectively. Using the DAD (Fig. 7), each amino acid in the standard mix can be resolved at a level of approximately 10 pmoles. The FLD (Fig. 8) shows higher sensitivity than the DAD.

Amino Acid	Retention % rsd	Peak Area % rsd
ASP	0.58	0.8
GLU	0.33	3.0
ASN	0.16	2.2
SER	0.12	2.8
GLN	0.12	2.4
HIS	0.11	2.7
GLY	0.15	2.5
THR	0.12	1.1
CIT	0.10	3.5
ARG	0.35	2.3
ALA	0.11	0.9
TYR	0.12	0.7
CY2	0.17	0.6
VAL	0.16	0.5
MET	0.17	1.1
NVA	0.15	0.7
TRP	0.18	0.8
PHE	0.14	0.8
ILE	0.14	1.1
LEU	0.18	1.0
LYS	0.19	3.2
HYP	0.13	4.2
SAR	0.14	6.8
PRO	0.12	2.7
Mean	0.18	2.0

Table 2: Reproducibility of the Zorbax Eclipse-AAA Protocol for the Analysis of Amino Acids. An Agilent 1100 System with quaternary pump was used. Values represent six replicate analyses.

CONCLUSION

Using OPA and FMOC chemistries, amino acid analysis of protein and peptide hydrolysates can be performed in ten minutes using the Zorbax Eclipse-AAA column and

the Agilent 1100 HPLC. This separation approach offers improved retention of five critical pairs compared to the original AminoQuant method on the HP1090 HPLC system. The reproducibility of the analysis of amino acids on the Eclipse-AAA column is comparable to that of the original AminoQuant method, and the mobile phase is more straightforward to prepare with only a pH adjustment of the buffer (solvent A) needed.

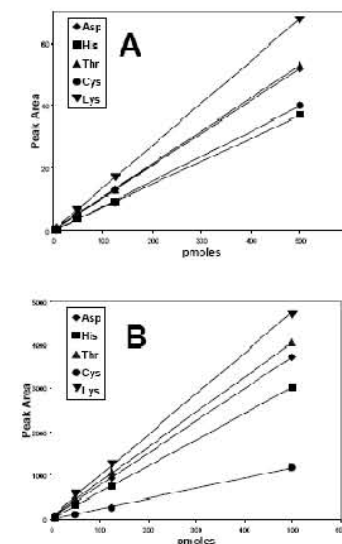


Figure 6: Calibration curves for analysis of amino acid derivatives by UV (A) or FLD (B) detection. Linearity is demonstrated for the concentration range of 4.5 to 450 pmoles in 0.5 µl of sample.

The choice of column depends upon the analysis speed and resolution desired:

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 75 mm (3.5 µm) for routine sensitivity, high-throughput work using the DAD.

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm (5 µm), for routine sensitivity, high-resolution work at lower back pressures, using the DAD



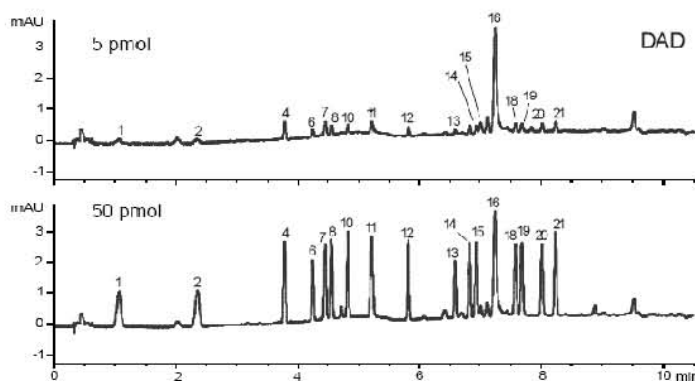


Figure 7: UV-Detector Response 338 nm (OPA-derivatives) Using Different Concentrations of Amino Acids.

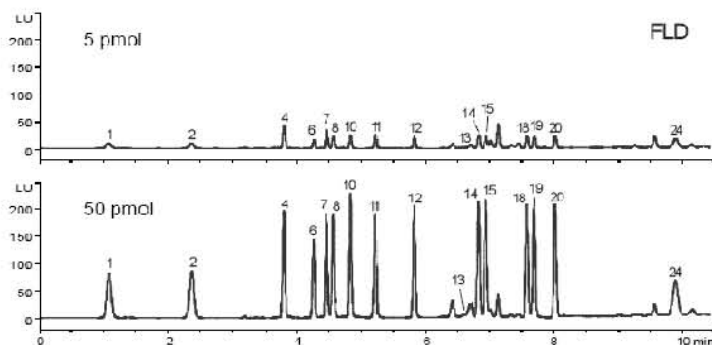


Figure 8: Fluorescence-Detector Response Using Different Concentrations Amino Acids. Gain for the Photomultiplier Tube (PMT) = 10.

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm (3.5 µm), for high sensitivity, high-resolution work using the FLD

ZORBAX Eclipse-AAA
3.0 x 150 mm, (3.5 µm), available in Fall of 2000, is for high sensitivity, high resolution work with less solvent and sample consumption.

Using the Agilent 1313A auto-sampler to automate the pre-column derivatization procedure results in a speedy and reproducible reaction with minimal operator intervention. This protocol can be used for routine analysis of both primary and secondary amino acids using the DAD and collecting two wavelengths, or with programmed wavelength switching.

For high-sensitivity work, the fluorescence detector is required.

EXPERIMENTAL CONDITIONS

Chromatograms shown in Figures 1 – 8 were obtained using the following experimental conditions:

Instrument

The recommended chromatographic system is the Agilent 1100 HPLC: G1312A Binary pump with G1315A Diode Array Detector (DAD), 6-mm or 10-mm flow cell, and/or G1315A Fluorescence Detector (FLD). While the results shown here were obtained the binary pump, this procedure has also been used with the Agilent 1100 quaternary pump (G1311A).

HPLC Columns

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 75 mm, 3.5 µm
PN 963400-902

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm, 3.5 µm
PN 963400-902

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm, 5 µm
PN 993400-902
Optional guard column*
ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 12.5 mm, 5 µm, 4/PK
PN 820950-931

ZORBAX Eclipse-AAA

3.0 x 150 mm, 3.5 µm

Available in Fall of 2000.

* The optional guard column should be installed directly preceding the analytical column, using a low dead-volume connector.

Mobile Phase

A: 40 mM Na₂HPO₄ pH 7.8 [5.5 g NaH₂PO₄, monohydrate + 1 liter water, adjust to pH 7.8 with NaOH solution (10 N)]

B: ACN: MeOH: water (45:45:10, v/v/v)

It is convenient to make Mobile Phase A as a 10X stock solution with no pH adjustment. The solution can be kept for several weeks and can be diluted and titrated to pH 7.8, as needed. All mobile-phase solvents should be HPLC grade.

Pump Settings

Flow: 2 mL/min
Stoptime: 14 min (75-mm column) or 26 min (150-mm column)
Post time: off

Auxiliary Pump Settings:

Max. flow ramp: 100 mL/min²
Compressibility A: 50 x 10⁻⁶
Minimal Stroke A: 20 µL
Compressibility B: 115 x 10⁻⁶
Minimal Stroke B: Auto





Gradients:

For 75 mm column length

Time (min)	% B
0	0
1	0
9.8	57
10	100
12	100
12.5	0
14	0

For 150 mm column length

Time (min)	% B
0	0
1.9	0
18.1	57
18.6	100
22.3	100
232	0
26	0

Note: To extend column life, flush column with 10 column volumes of 100% B when column will not be used for periods of overnight or longer.

Detector Settings

DAD:

Required Lamps:

UV lamp: yes

Vis. lamp: no

UV: 338 nm, 10 nm bandwidth

(bw), reference: 390 nm, 20 nm bw (for OPA-amino acids)

262 nm, 16 nm bw, reference: 324 nm, 8 nm bw (for FMOC-amino acids)

Peakwidth: >0.03 min (0.5 s)

Slit: 4 nm

FLD:

For 75 mm column

Time (min)	Ex/Em (nm)	PMT Gain
0	340/450	10
8.5*	266/305	9

For 150 mm column

Time (min)	Ex/Em (nm)	PMT Gain
0	340/450	10
15*	266/305	9

*The specific time to switch fluo-

rescence wavelengths may differ due to variations in temperature, mobile phase, etc.

Peakwidth: >0.5 min

Autosampler:

See vial positioning (Fig. 9)

Injector program:

Draw 2.5 µL from vial 1 (borate buffer)
 Draw 0.5 µL from sample (e.g., choose vial position #11 for amino acid sample)
 Mix 3 µL "in air", max speed, 2x
 Wait 0.5 min
 Draw 0 µL from vial 2 (needle wash using water in uncapped vial)
 Draw 0.5 µL from vial 3 (OPA)
 Mix 3.5 µL "in air", max speed, 6x
 Draw 0 µL from vial 2 (needle wash using water in uncapped vial)
 Draw 0.5 µL from vial 4 (FMOC)
 Mix 4 µL "in air", max speed, 6x [Optional needle rinse for high sensitivity use: Draw 0.0 µL from vial 6 (ACN, acetonitrile)]
 Draw 32 µL from vial 5 (water)
 Mix 18 µL "in air", max speed, 2x
 Inject

Auxiliary:

Drawspeed: 200 µL/min
 Ejectspeed: 600 µL/min
 Draw position: 0.0 mm

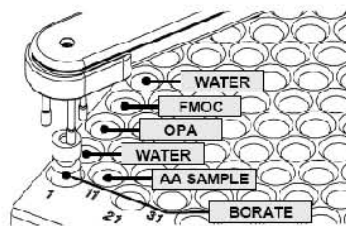


Figure 9: Position of reagent vials in the Agilent 1313A autosampler. This positioning of vials is designed for the listed injector program.

Vials:

Conical vial inserts with polymer feet (Fig. 10A) are required to hold the OPA and FMOC reagents

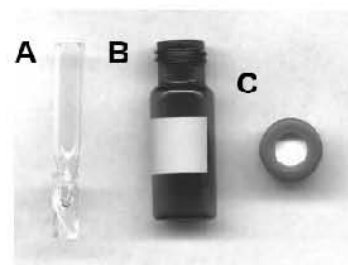


Figure 10: Insert, Vial, and Cap. Photo of conical insert A (Agilent PN 5181-1270), amber wide-opening vial B (Agilent PN 5182-0716), and screw cap C (Agilent PN 5182-0721), for amino acid analysis using the Agilent 1100 autosampler.

because of the limited volumes involved. The inserts are compatible with wide-opening screw-top (Fig. 10B-C) or crimp-top vials. For this procedure snap-cap vials should not be used because an airtight seal is needed for both FMOC, because it is highly volatile, and OPA, because it slowly degrades in the presence of oxygen. Be careful not to use vials or caps designed for other instruments, as these may damage the Agilent G1313A autosampler.

Column Compartment:

Temperature: 40°C (left and right side)

Enable analysis: When temperature is within setpoint +/- 0.8°C

Derivatization Reagents

Borate Buffer:

Agilent PN 5061-3339

Solution is 0.4 N in water, pH 10.2. Keep refrigerated (4°C). Dispense as necessary.

FMOC Reagent:

Agilent PN 5061-3337

Pipette 100-µL aliquots of the 1-mL FMOC reagent into conical inserts, cap immediately and refrigerate (4°C); solution is useable for 7 - 10 days, maximum, after dispensing.



**OPA Reagent:**

Agilent PN 5061-3335

Pipette 100 μL aliquots of the 1-mL OPA reagent into conical inserts, cap immediately and refrigerate (4°C); solution is useable for 7 - 10 days, maximum, after dispensing.

Water: Deionized, HPLC grade

See *Ordering Information* for descriptions and part numbers.

SAMPLE PREPARATION

Note: Each reagent vial should be replaced every day. Each 1 mL ampoule of reagent contains sufficient solution to last about ten days ($1000\ \mu\text{L}/100\ \mu\text{L} = 10$ days).

Amino Acid Mix for Chromatographic Comparisons

For chromatographic analyses, 17 amino acids from the 250 pmol/ μL standard mix (PN: 5061-3331), plus citrulline and the 6 supplemental amino acids, were combined at a concentration of approximately 250 pmol/ μL . The mixture was prepared by combining the two stock solutions described below. Add 1 μL of the supplemental amino acid stock solution to a fresh aliquot of the 250-pmole standard (100 μL) in the conical vial insert. Mix using a vortex mixer to complete the 24-component standard ready for injection (250 $\mu\text{mol/L}$).

250 pmole standard:

Divide 1 mL ampoule of 250 pmol/ μL amino acids (PN 5061-3331) into 100 μL portions in conical vial inserts, cap and refrigerate aliquots at 4°C .

Supplemental amino acid stock solution:

Weigh about 0.25 mmoles of each auxiliary amino acid (gln, asn, trp, nva, hyp, sar) from kit (PN 5062-2478) into a 20-mL vial. Add 5 mL deionized water and sonicate in a

hot water bath until dissolved.

Add another 5 mL water to complete dilution. Store in refrigerator (4°C). Citrulline (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) was added in this mix at the same concentration.

For storage, do **not** combine supplemental amino acids with amino acid standards. Some of these supplemental amino acids degrade in HCl (especially glutamine, and to a lesser extent, asparagine).

Amino Acid Mix for Calibration Curves

For the construction of calibration curves, 17 amino acids, plus the 4 extended amino acids, are combined at various concentrations with fixed amounts of internal standards. The internal standards (ISTD) (norvaline and sarcosine) are part of the supplemental amino acid kit (PN: 5062-2478). The remaining amino acids in this kit (gln, asn, trp, hyp) form the extended amino acids (EAA). To make the appropriate solutions, refer to Tables 3 and 4 for low and high sensitivity standards, respectively.

Amino acid standards (10 pmol/ μL to 1 nmol/ μL):

Divide each 1 mL ampoule of standards PN 5061-3330 through 5061-3334) into 100 μL portions in conical vial inserts, cap and refrigerate aliquots at 4°C . Calibration curves may be made using from 2 to 5 standards, depending on experimental need.

Extended amino acid (EAA) stock solution:

This solution is made using four of the six amino acids in the supplemental amino acid kit (PN: 5062-2478). For use with low-sensitivity standards (Table 3), make a 25-mL

solution containing 18 nmol/ μL of glutamine, asparagine, tryptophan, and 4-hydroxy-proline in deionized water. Sonicate the solution until dissolved. Store the solution refrigerated at 4°C . For use with high-sensitivity standards (Table 4), make a 1.8 nmol/ μL solution by diluting 5 mL of the 18 nmol/ μL standard with 45 mL deionized H_2O .

Internal standards (ISTD) stock solution:

These solutions are made using two of the six amino acids in the supplemental amino acid kit (PN: 5062-2478). For use with low-sensitivity standards (Table 3), make a 25-mL solution containing 10 nmol/ μL of norvaline and sarcosine in deionized water. Sonicate the solution until dissolved. Store in refrigerator (4°C). For use with high-sensitivity standards (Table 4), make a 1 nmol/ μL solution by diluting 5 mL of the 10 nmol/ μL standard with 45 mL deionized H_2O . Store in refrigerator (4°C).

ADDITIONAL SUPPORT

User-contributed Chemstation Method files for each column type, written documentation, as well as an amino acid report and macro, are available by download via the Agilent web site at www.agilent.com/chem, under "Technical Support" / "User Contributed Software".





Table 3: Preparation of Low-Sensitivity Amino Acid Standard Solutions. Prepare the three low-sensitivity standards by mixing together stock solutions in the volumes shown.

	Concentration of Final AA Solutions (pmol/ μ L)		
	900	225	90
Take 5 mL 18 nmol EAA	5mL	5mL	5mL
Dilute with 0.1NHCl	—	15mL	45mL
Diluted EAA mix	5mL	20mL	50mL
Take 5 mL diluted EAA mix	5mL	5mL	5mL
Add 10 nmol ISTD solution	5mL	5mL	5mL
EAA-ISTD mix	10mL	10mL	10mL
Take 100 μ L EAA-ISTD mix	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Add 1000 pmol AA standard	900 μ L	—	—
Add 250 pmol AA standard	—	900 μ L	—
Add 100 pmol AA standard	—	—	900 μ L
Final AA Solution with EAA and 500 pmol/μL ISTD	1 mL	1 mL	1 mL

Table 4: Preparation of High-Sensitivity Amino Acid Standard Solutions. Prepare the three high-sensitivity standards by mixing together stock solutions in the volumes shown.

	Concentration of Final AA Solutions (pmol/ μ L)		
	90	22.5	9
Take 5 mL 1.8 nmol EAA	5mL	5mL	5mL
Dilute with 0.1NHCl	—	15mL	45mL
Diluted EAA mix	5mL	20mL	50mL
Take 5 mL diluted EAA mix	5mL	5mL	5mL
Add 1 nmol ISTD solution	5mL	5mL	5mL
EAA-ISTD mix	10mL	10 mL	10 mL
Take 100 μ L EAA-ISTD mix	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Add 100 pmol AA standard	900 μ L	—	—
Add 25 pmol AA standard	—	900 μ L	—
Add 10 pmol AA standard	—	—	900 μ L
Final AA Solution with EAA and 50 pmol/μL ISTD	1mL	1mL	1mL





ORDERING INFORMATION

Eclipse-AAA HPLC Columns

Description	Size (mm)	Particle Size (µm)	Agilent Part No.
Analytical routine sensitivity, high-resolution	4.6 x 150	5µm	993400-902
Analytical high sensitivity, high resolution work using the FLD	4.6 x 150	3.5µm	963400-902
Analytical, routine sensitivity, high-throughput	4.6 x 75	3.5µm	966400-902
Analytical high sensitivity, high resolution work—DAD or FLD	3.0 x 150	3.5µm	961400-302
Guard (4/pk)	4.6 x 12.5	5µm	820950-931
Guard Hardware Kit	—	—	820777-901

Derivatization Reagents

Description	Agilent Part No.
Borate Buffer: 0.4 M in water, pH 10.2, 100mL	5061-3339
FMOc Reagent, 2.5 mg/mL in ACN, 10 x 1 mL ampoules	5061-3337
OPA Reagent, 10mg/mL in 0.4M borate buffer and 3-mercaptoproprionic acid, 6 x 1mL ampoules	5061-3335
DTDPA Reagent for analysis of cysteine, 5g	5062-2479

Vials

Description	Agilent Part No.
100 µL Conical insert with polymer feet, 100/pk Amber, wide-opening, write-on, screw-top vial, 2mL, 100/pk	5181-1270
Green Screw Cap, PTFE/silicone septum, 100/pk	5182-0716
	5182-0721

Standards

Description	Agilent Part No.
Amino Acid Standard in 0.1 M HCl, 10 x 1mL ampoules	
1 nmol /ml	5061-3330
250 pmol /ml	5061-3331
100 pmol /ml	5061-3332
25 pmol /ml	5061-3333
10 pmol /ml	5061-3334
Supplemental Amino Acids: Nva, Sar, Asn, Gln, Trp, Hyp, 1g each	5062-2478

Additional Support

Description
User-contributed Chemstation method files, custom amino-acid report and macro, and any additional documentation are available through the web at www.agilent.com/chem under "Technical Support" / "User Contributed Software".





Copyright 2000 Agilent Technologies All Rights Reserved. Reproduction, adaptation or translation without prior written permission is prohibited, except as allowed under the copyright laws.



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

For more information on our products, visit the Agilent Technologies home page at: www.agilent.com/chem/supplies

Printed in USA
Part No. 5960-1185E





Apéndice 2. Ejemplo de cálculo de las disoluciones de la curva de calibración.

Aspartato

Masa pesada: 0.0133 g

Masa molecular: 132.12 g/ mol

Para preparar 10mL de una solución 10 mM

$$\frac{10 \text{ mmol}}{\text{L}} \times 0.01 \text{ L} = 0.1 \text{ mmol}$$

$$0.1 \text{ mmol} \times \frac{0.13212 \text{ g}}{1 \text{ mmol}} = 0.0132 \text{ g de Aspartato}$$

$$\frac{0.0133 \text{ g}}{(132.12 \text{ g/ mol})} = 1.006 \text{ E}^{-4} \text{ mol}$$

$$\frac{1.006 \text{ E}^{-4} \text{ mol}}{0.01 \text{ L}} = 0.0101 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{98\%}{100\%} = 0.00987 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$0.00987 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{10^3 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} = 9.87 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$$

$$9.87 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \times \frac{200 \mu\text{L}}{10000 \mu\text{L}} \times \frac{10^3 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} = 197 \mu\text{M} \quad \text{Concentración sol. madre}$$

$$197 \mu\text{M} \times \frac{80 \mu\text{L}}{880 \mu\text{L}} = 179 \mu\text{M}$$

$$179 \mu\text{M} \times \frac{600 \mu\text{L}}{900 \mu\text{L}} = 120 \mu\text{M}$$

$$120 \mu\text{M} \times \frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 120 \mu\text{M} \quad \dots$$





Apéndice 3. Programa de inyección para el análisis de aminoácidos.

El programa de inyección de las muestras fue modificado con respecto al método de referencia, en la cantidad de muestra utilizada; de 5 μL en lugar de 0.5 μL .

Número	Acción	Cantidad	Ubicación	Reactivo
1	Tomar	2.5 μL	Vial 1	Buffer de borato
2	Tomar	5.0 μL	Cualquier ubicación en el plato	Muestra
3	Mezclar(2 veces)	7.5 μL	Loop	-----
4	Esperar	0.5 min	-----	-----
5	Tomar	0	Vial 2	Agua para lavado externo de aguja.
6	Tomar	0.5 μL	Vial 3	Reactivo OPA
7	Mezclar (6 veces)	8.0	Loop	-----
8	Tomar	0	Vial 2	Agua para lavado externo de aguja.
9	Tomar	0	Vial 5	Acetonitrilo, para lavado externo de aguja





Apéndice 4. Ejemplo de un cromatograma obtenido de un individuo con DM2.

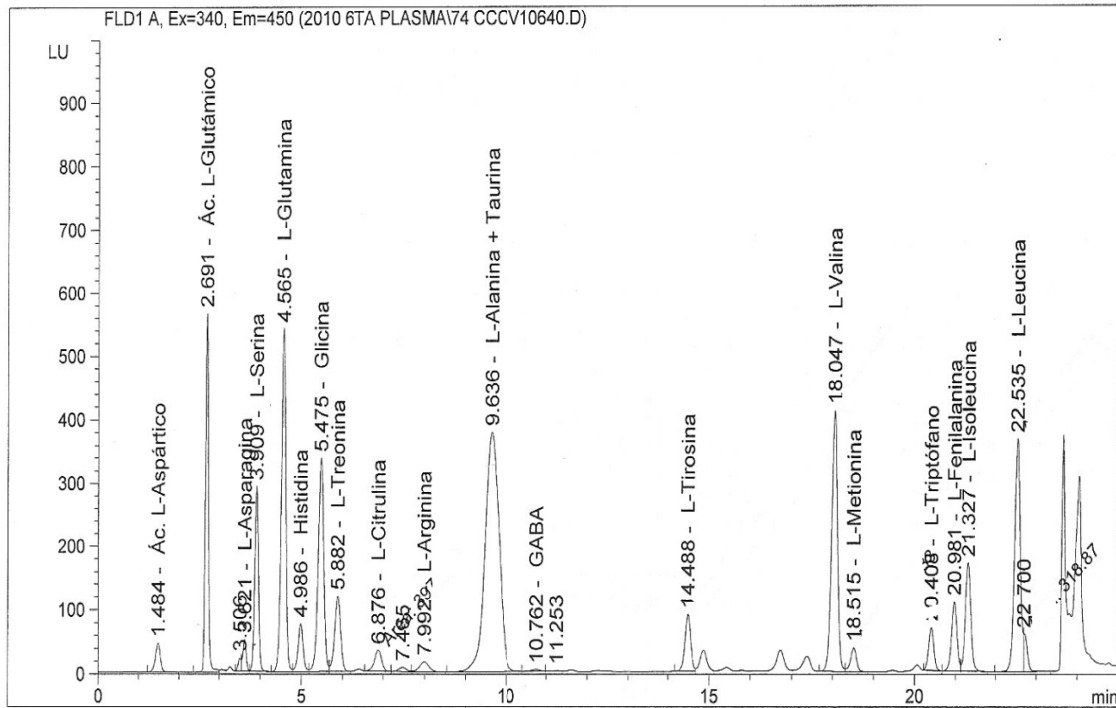


Figura 1. El cromatograma muestra las señales obtenidas de cada aminoácido separado, así como el tiempo de retención.



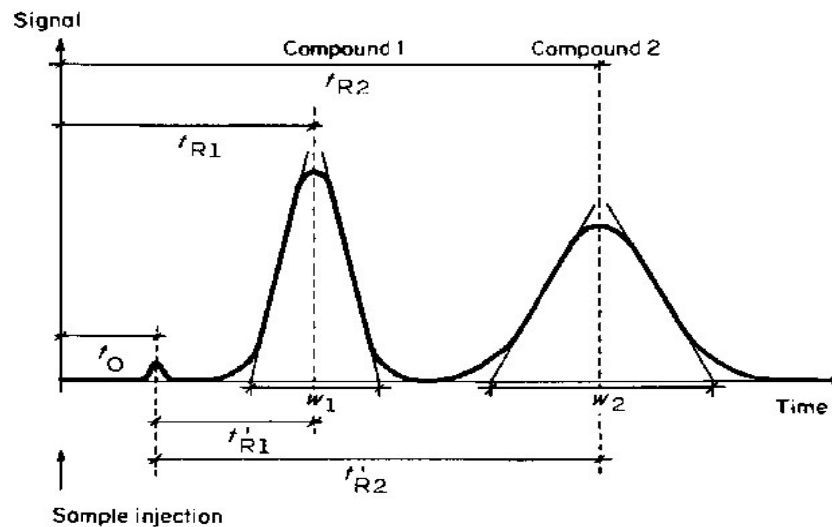
Apéndice 5. Conceptos y parámetros cromatográficos.^{36, 50}

Figura 2. Cromatograma: parámetros característicos.

Altura (h): Altura de pico.

Anchura de base (W): Suele ser el intervalo de longitud de frecuencia de un pico; el intervalo pasa por un separador de banda.

Banda o pico cromatografico: Es una situación ideal, es una distribución gaussiana. La cantidad de compuesto que sale de cromatografico o de una columna electroforética.

Coefficiente de difusión: Medida de la movilidad de una especie en unidades de cm^2/s .

Coefficiente de reparto (k_D): Constante de equilibrio que describe la distribución de un soluto entre dos fases, para definir el coeficiente de partición solo se utiliza una forma de un soluto.

Coefficiente de selectividad: Medida de la sensibilidad de un método para un interferente dado en comparación con su sensibilidad para el analito ($K_{A,I}$).





Constante de equilibrio (K'): Constante que se basa en las concentraciones molares al equilibrio, su valor numérico de K' depende de la fuerza iónica del medio.

Cromatografía: Separación en la que los solutos se distribuyen entre fase móvil y estacionaria.

Cromatograma: Registro de la señal de detección en función del tiempo de elusión o del volumen.

Eficiencia de la columna: Medida del grado de ensanchamiento de una banda cromatográfica, se suele expresar en términos de la altura H , de los platos o del número N de platos teóricos. En la medida en que la distribución del analito dentro de la banda es gaussiana, la altura de los platos está dada por la varianza dividida entre la longitud de la columna del empacado.

Factor de capacidad (k'): Medida de la fortaleza con la que la fase estacionaria retiene en soluto dado.

Factor de selectividad (α): Cociente de los factores de capacidad de dos solutos que muestra la selectividad de la columna para uno de ellos.

Factor de separación: Medida de la eficacia de una separación en lo que se refiere a la separación entre el analito y el interferente.

Fase estacionaria: fase extractante que permanece en posición fija.

Fase móvil: fase extractante que se desplaza a través del sistema.

Número de platos teóricos: Característica de una columna cromatográfica que se emplea para medir su eficiencia.

Plato teórico: Medio cuantitativo para evaluar la eficacia de una columna y que consiste en tratar una columna, como si estuviera compuesta de pequeñas zonas o platos, en las que tiene lugar el reparto entre las fases móvil y estacionaria.





Resolución (R): separación entre dos bandas cromatográficas.

Selectividad: Medida de la ausencia de interferencia de un método que se mide ante el cociente de selectividad del mismo.

Tiempo de retención (t_R): tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el componente llega al detector.

Tiempo muerto (t_M): tiempo necesario para que una especie no retenida pase a través de la columna y llegue al detector.

Volumen muerto (V_M): volumen de fase móvil que se requiere para eluir una especie no retenida.

Volumen de retención (V_R): volumen de fase móvil que se requiere para eluir un soluto de la columna cromatográfica.





VII BIBLIOGRAFÍA

1. Programa Nacional de Salud 2007-2012
2. Fauci Anthony S., et al; Harrison Principios de Medicina Interna. 17ª edición. Mc Graw Hill.
3. Fuentes Arderiu X., et al. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. 2ª edición. Reverte. vol.II.
4. Akter K.,et.al; Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment?. British Journal of Clinical Pharmacology. 71:3 2010.
5. Philip Newsholme, Lorraine Brennan and Katrin Bender. Amino Acid Metabolism, β -Cell Function, and Diabetes. Diabetes, vol. 55, supplement 2, december 2006.
6. Wade L.G Jr. Química Orgánica. 5ª edición. Pearson Prentice Hall.
7. Carey Francis A. Química Orgánica. 6ª edición. Mc Graw Hill.
8. Shils Maurice E., et al; Nutrición en salud y enfermedad. 9ª edición. Mc Graw Hill Interamericana. Vol.1. 2002.
9. Bermudez., et al. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. AVFT. Vol.26, no.2, 2007.
10. Wright, E.M. 2001 Renal Na^+ - glucose cotransporter. Am J Physiol Renal.
11. White John Jr. Apple trees to sodium glucose co-transporter inhibitors: A review of SGLT2 inhibition. Clinical diabetes. Vol. 28, no.1, 2010.
12. Lloyd. E., Mc Donald B., Crampton E.W. Fundamentos de Nutrición. Acribia. Zaragoza España.
13. Stryer Lubert. Bioquímica. 4ª edición. Tomo II. Reverte.
14. Organización mundial de la salud
15. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care. Vol. 32, supplement 1, January 2009.
16. Ganong., et al; Fisiología médica. 23ª edición. Mc Graw Hill
17. Greenspan Francis S. Endocrinología Básica y Clínica. 3ª edición, El Manual Moderno, México DF. 1995.



18. Marcelino Hernández Valencia, Arturo Zárate. Conceptos recientes en la etiopatogenia de la diabetes gestacional. *Ginecol Obstet Mex.* 2005 73:371-7
19. Sánchez-Reyes., et al; Actualización en los diferentes subtipos de diabetes tipo MODY. *Endocrinología y Nutrición.* Vol, 9 no.1, 2001.pp5-11.
20. Araki E, Lipes MA, Patti ME. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994;372:186-90
21. Mendivil Anaya Carlos, Sierra Ariza Iván. Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. *Rev. Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia* 2005 Vol. 53 No. 4
22. William T. Cefalu Insulin Resistance: Cellular and Clinical Concepts *Exp. Biol. Med.* 2001;226:13-26
23. Suardíaz Jorge, Cruz Celso, Colina Ariel. *Laboratorio Clínico. Editorial Ciencias Médicas. La Habana Cuba* 2004.
24. Velasco Martín A., et al; *Farmacología Clínica y Terapéutica Médica. Mc Graw Hill Interamericana.*
25. Ullrich A, Bell JR, Chen E. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985; 313:756-61.
26. Shoelson, White, Kahn. Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alfa-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J Biol Chem* 1988; 263:4852-60.
27. Pirola, Johnston, Van Obberghen. Modulation of insulin action. *Diabetologia* 2004;47:170-84
28. Withers., et al; Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;391:900-4.
29. Okada T., et al; Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 1994;269:3568-73.
30. Skolnik E., et al; The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 1993; 260:1953-5.





31. Kimball, Farrell, Jefferson. Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol* 93:1168–1180, 2002.
32. Reimann F., et al; Glutamine potently stimulates glucagons-like peptide-1 secretion from GLUT cells. *Diabetologia* 47:1592–1601, 2001.
33. Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Rhodes CJ: Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells *Diabetes* 52:974 –983, 2003
34. Leclerc, Rutter. AMP-activated protein kinase: a new beta-cell glucose sensor. Regulation by amino acids and calcium ions. *Diabetes*. Vol. 53 suppl.3:S67–S74, 2004.
35. Weston Andrea. Brown Phyllis R. HPLC and CE. Principles and Practice.
36. Hernández L. y González C. Introducción al análisis instrumental. Ed. Ariel Ciencia. 2002.
37. Rouessac F. y Rouessac A. Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas”. Mc Graw Hill. 2003.
38. Skoog D. A., West, D. M., Holler, F. Química analítica. 7ª edición. Mc Graw Hill 2001.
39. Lindsay S. High Performance Liquid Chromatography. 2nd ed., John Wiley and Sons, UK, 1992.
40. Harris D. C. Análisis químico cuantitativo. Reverte, S. A. Barcelona. 2001.
41. Valcárcel Cases A. Gómez Hens. Técnicas analíticas de separación. Reverte Barcelona 1990.
42. Rosado Pérez Juana, Mendoza Núñez Víctor M. Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*. Vol. 32 no. 2 Abril-jun 2007.
43. Kaplan A., et al; Glucose. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984; 1032-1036.
44. Burtis A., et al; Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. 1999.
45. Murray R.L. Creatinine. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984; 1261-1266 and 418.





46. Sreekumaran Nair and Kevin R. Hormonal and Signaling Role of Branched-Chain Amino Acids. The American society for nutritional sciences. Junio 2007.
47. Guoyao Wu. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009 37:1–17
48. Harper., et al; *Bioquímica ilustrada*. 28^a edición. Mc Graw Hill Lange.
49. Maechler P., et al; Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic beta-cells. *EMBO J* 16:3833–3841, 1997.
50. Heftmann, E. *Chromatography: Fundamentals and Applications of chromatography and related differential migration methods*, Elsevier Science Publishers B.V, 5a. edición, EUA, 1992.

