

20
201



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**EL PERFIL DEL METABOLISMO INTERMEDIO EN
NIÑOS Y ADULTOS MEXICANOS Y EN UNA PACIENTE
CON DEFICIENCIA MULTIPLE DE CARBOXILASAS**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A**

MARIA DEL CARMEN GARAY ARIAS

DR. ANTONIO VELAZQUEZ ARELLANO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pág.
CAPITULO I. RESUMEN.	1
CAPITULO II. INTRODUCCION.	7
CAPITULO III. OBJETIVOS.	11
CAPITULO IV. SECCION TEORICA.	15
1. Generalidades.	16
1.1. Metabolismo.	16
1.2. Errores innatos del metabolismo.	22
1.3. Fundamento teórico de las Técnicas microfluorométricas enzimáticas.	27
2. Glucosa.	32
3. Piruvato y Lactato.	60
4. Alanina.	83
5. Cuerpos cetónicos (β -Hidroxibutirato y Acetoacetato).	98
6. Citrato.	115
7. α Cetoglutarato.	125
8. Glutamato.	134
9. Glutamina.	142
10. Aspartato.	152
 CAPITULO V. SECCION EXPERIMENTAL.	 163
1. Procedimiento para la estandarización de las técnicas microfluorométricas - ensayadas.	164
1.1. Metodología.	164
1.2. Preparación del extracto neutro de plasma.	168
1.3. Parámetros de estandarización de las Técnicas: exactitud, especificidad, reproducibilidad y sensibilidad.	168

	Pág.
1.4. Preparación del extracto neutro de soluciones estandar.	171
2. El perfil metabólico basal de niños y adultos de una población mexicana normal.	172
2.1. Selección de la población normal -- estudiada.	172
2.2. Valores normales de metabolitos en plasma de la población infantil -- estudiada.	173
2.3. Valores normales de metabolitos en plasma de la población de adultos - estudiada.	175
3. Montaje de las técnicas microfluorométricas enzimáticas para la medición de los metabolitos incluidos en esta Tesis.	177
3.1. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de glucosa.	177
3.2. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de piruvato.	181
3.3. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de lactato.	185
3.4. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de alanina.	189
3.5. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de β -Hidroxibutirato.	194
3.6. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de acetoacetato.	198
3.7. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de citrato.	202
3.8. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de α -cetoglutarato.	206
3.9. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de glutamato.	211
3.10. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de glutamina.	215
3.11. Procedimiento analítico para la <u>d</u> eterminación de aspartato.	220

	Pág.
CAPITULO VI. ESTUDIO DEL PERFIL METABOLICO DINAMICO DE UNA PACIENTE CON ACIDOSIS LACTICO-PIRUVICA DEBIDA A DEFICIENCIA DE LAS CARBOXILASAS DE PIRUVATO, PROPIONIL-CoA Y β -METILCROTONIL-CoA.	224
1. Caso clínico.	225
2. Material y Métodos.	227
3. Resultados y discusión de experimentos <u>in vivo</u>	230
3.1. Terapia con megadosis oral de tiamina.	230
3.2. Terapia con megadosis oral de biotina.	230
3.3. Estudio de tolerancia de glucosa oral.	233
3.4. Estudio de infusión I.V. de alanina.	234
3.5. Estudio de infusión I.V. de glucosa concomitante a la administración de biotina.	237
3.6. Estudio de infusión I.V. de alanina concomitante a la aplicación de terapia con biotina.	239
3.7. Respuesta bioquímica a ayuno de 24 - horas.	241
3.8. Estudios experimentales de cetosis (prescripción de dietas cetónicas)	243
CAPITULO VII. CONCLUSIONES.	252
CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFIA.	259

ABREVIATURAS DE COMPUESTOS QUIMICOS Y BIOQUIMICOS

AcCoA	Acetil-coenzima A
AcAc	Acetoacetato
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADP	Adenosina-5'-difosfato
Ala	Alanina
ALT (GPT)	Alanina aminotransferasa (Glutamato-piruvato transaminasa)
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
AMP _c	Adenosin monofosfato 3', 5'- cíclico
AST (GOT)	Aspartato aminotransferasa (Glutamato-oxalacetato transaminasa)
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CL	Citrato liasa
CoA, CoA-SH	Coenzima A
CS	Citrato sintasa
DLT, E ₂	Dihidrolipoil transacetilasa
FAD	Flavina-adenina dinucleótido
FADH ₂	Flavina-adenina dinucleótido reducido
F-1-P	Fructosa-1-fosfato
F-6-P	Fructosa-6-fosfato
F-1,6-P ₂	Fructosa-1,6-difosfato
GABA	γ-aminobutirato
GDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
GAP	Gliceraldehido-3-fosfato
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GOT (AST)	Glutamato-oxalacetato transaminasa (aspartato aminotransferasa).
G-1-P	Glucosa-1-fosfato
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
G6P-DH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GPT (ALT)	Glutamato-piruvato transaminasa (alanina aminotransferasa)
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
GSH	Glutati3n reducido
GSS	Glutati3n
β -HB	β -Hidroxi butirato
β -HBDH	β -Hidroxi butirato deshidrogenasa
β -HB/AcAc	β -Hidroxi butirato/Acetoacetato
Hb-M	Metahemoglobina
HK	Hexocinasa
HMGCoa	β -Hidroxi- β -metilglutaril-CoA
IMP	Inosina-5'-fosfato
L	Lactato
L/P	Lactato/Piruvato
LAD, E ₃	Dihidrolipoil deshidrogenasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
Mal	Malato
Mal/Oxa	Malato/Oxalacetato
MDH	Malato deshidrogenasa
β -MCC	β -metilcrotonil-CoA carboxilasa
NAD	Nicotinamida-adenina dinucle3tido
NADH	Nicotinamida-adenina dinucle3tido reducido
NADP	Nicotinamida-adenina dinucle3tido fosfato
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucle3tido fosfato reducido
NEFA	Acidos grasos no esterificados de cadenas largas
Oxa	Oxalacetato
PC	Piruvato carboxilasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PDH, E ₁	Piruvato deshidrogenasa
PDH _a	Piruvato deshidrogenasa cinasa
PDH _b	Piruvato deshidrogenasa fosfatasa
PDHC	Piruvato deshidrogenasa complejo multienzimático
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinas

PFK	Fosfofructocinasa
3-PG	3-fosfoglicerato
PGK	Fosfoglicerato cinasa
1,3-PGP	1,3-difosfoglicerato
P_i	Fosfato inorgánico
Pir	Piruvato
PK	Piruvato cinasa
TPP	Pirofosfato de tiamina
THAM	Tris-hidroxi-aminometano
UDP-G	Uridín-difosfo-glucosa

ABREVIATURAS DE SIMBOLOS

V	Velocidad máxima de reacción enzimática
K_m	Constante de Michaelis
K_i	Constante Inhibitoria
ϵ	Coefficiente decádico de absortividad molar
UI	Unidad internacional de enzima
UF	Unidad fluorométrica
DO	Densidad óptica
M	Valor promedio
ES	Desviación estandar
CV	Coefficiente de variación
r	Coefficiente de correlación

CAPITULO I

R E S U M E N

El proyecto de tesis incluye el trazo de curvas estandar - adecuadas para cada uno de los siguientes sustratos: glucosa, piruvato, lactato, alanina, β -hidroxibutirato, acetoacetato, citrato, α -cetoglutarato, glutamato, glutamina y aspartato. El trazo de las curvas estandar se hará graficando la relación concentración creciente del sustrato particular contra incremento o decremento en fluorescencia (unidades fluorométricas, UF). Las técnicas se estandarizarán evaluando los siguientes parámetros: exactitud, precisión, reproducibilidad y sensibilidad. La estandarización se efectuará empleando un "lote mixto" de plasmás. Este contendrá cantidades conocidas de una mezcla de sustratos exógenos.

La cuantificación de metabolitos en las muestras biológicas (sangre o plasma) será mediante la construcción de las curvas estandar ya mencionadas. El perfil metabólico basal normal en niños se obtendrá de una población seleccionada del Servicio de Genética del Instituto Nacional de Pediatría DIF. El perfil basal normal de adultos se obtendrá de una población de la Unidad de -- Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas -- UNAM.

El perfil de valores bioquímico-clínicos de metabolitos en individuos mexicanos detallará por vez primera el metabolismo basal de la población mexicana normal. Constituirá un estandar de niveles normales y se utilizará para caracterizar el sitio exacto de la deficiencia o bloqueo enzimático en pacientes con errores -- innatos del metabolismo. Conforme a la sintomatología clínica y

a las alteraciones bioquímicas peculiares inherentes a un bloqueo enzimático específico, es posible especular sobre la eficacia de intervenciones terapéuticas adecuadas.

En este proyecto de investigación se presentarán los estudios practicados a una paciente con deterioro neurológico severo y cuadro de acidosis láctico-pirúvica persistente. Se intentará integrar el fenotipo clínico y bioquímico de la paciente y se evidenciará el bloqueo metabólico responsable de la hiperalaninemia, hiperpiruvicemia e hiperlactatemia característicos de esta aberración en el metabolismo del piruvato.

Estudios previos han establecido tentativamente que la paciente presenta deficiencia múltiple de carboxilasas -propionil-CoA carboxilasa, β -metil-crotonil-CoA carboxilasa y piruvato carboxilasa, enzimas que requieren de biotina como cofactor-. El perfil metabólico anormal en esta paciente nos permitirá conocer en qué medida el bloqueo anaplerótico más importante del ciclo de los -- ácidos tricarboxílicos contribuye a retrasar el flujo de metabolitos por el mismo. Este mecanismo deprimido posiblemente ocasione las lesiones neurológicas irreversibles, metabolismo energético cerebral inhibido, que se manifiestan en la deficiencia de piruvato carboxilasa.

Se investigará el perfil metabólico dinámico de la paciente observando las respuestas bioquímicas, curvas metabólicas, a sobrecargas de sustratos (experimentos in vivo).

Las curvas de tolerancia comprenden:

- La administración intravenosa (I.V.) u oral de glucosa o alanina, ambas fueron aplicadas con o sin la administración de biotina.
- La respuesta bioquímica después de un ayuno de 24 horas.
- El estudio metabólico de la niña expuesta a una dieta cetogénica (60-85% de las calorías totales suministradas - provistas por grasas). Las curvas metabólicas evidenciarán el comportamiento bioquímico alterado en la paciente.

En periodos previos, la niña fue sometida a estas pruebas, a excepción de los estudios cetogénicos, obteniéndose las muestras biológicas (sangre) respectivas, las cuales se mantuvieron en congelación y que serán empleadas para el desarrollo de esta investigación.

Los estudios bioquímicos antes mencionados comprendieron dos fases:

1. Cuando la paciente recibía terapia con megadosis de biotina (cofactor de la enzima piruvato carboxilasa), se realizaron las siguientes pruebas,
 - a) infusión (I.V.) de alanina
 - b) administración oral de una mezcla de aminoácidos ácido aspártico: ácido glutámico (1:1)
 - c) infusión (I.V.) de glucosa

2. Cuando la paciente no recibía terapia con biotina fue sometida a las siguientes pruebas,
- a) infusión (I.V.) de alanina
 - b) administración oral de una mezcla de aminoácidos ácido aspártico: ácido glutámico (1:1)
 - c) ayuno prolongado de 24 horas
 - d) prescripción de dietas cetogénicas

La terapia de aspartato, glutamato o bien glutamina --precursores que no requieren de piruvato carboxilasa para incorporarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos-- incrementará la actividad del ciclo. Además, el glutamato es un precursor potencial del neurotransmisor inhibitorio γ -aminobutirato (GABA) cuya síntesis posiblemente esté limitada a causa del flujo disminuido de metabolitos a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Ambos efectos pueden tener valor terapéutico en el control de las crisis convulsivas manifiestas.

Otro estudio con posibles implicaciones terapéuticas en la paciente es el determinar si la dieta cetogénica regula por sí sola la actividad convulsiva vía aumento de la actividad catalítica de la piruvato carboxilasa. La dieta rica en triglicéridos de cadena media elevará la poza intracelular de acetil-CoA, modulador alostérico de la piruvato carboxilasa, a través de una vía no bloqueada (β -oxidación) y por ende, estimulará el flujo gluconeogénico.

El estudio de las respuestas bioquímicas alteradas en la -

paciente, después de someterla a sobrecargas de sustratos exógenos, nos permitirá conocer más a fondo la integración, regulación y complejidad de los destinos metabólicos del piruvato (clave central del metabolismo intermediario) en las vías glucolítica, oxidación total a CO_2 y H_2O , en lipogénesis y en la vía gluconeogénica.

Se evaluará si la biotina normaliza la alteración metabólica fundamentalmente la actividad catalítica de la piruvato carboxilasa. Esta enzima es crucial en la regulación del flujo y niveles de metabolitos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (función anaplerótica), modula la distribución fraccional de acetyl-CoA en colesterogénesis, cetogénesis y lipogénesis. La piruvato carboxilasa es la enzima gluconeogénica por excelencia. Se evidenciará si el disturbio enzimático constituye una "dependencia vitamínica hereditaria" en la cual el bloqueo genético se supere con la administración del cofactor en dosis farmacológicas.

Se intentará explicar si la respuesta normoglicémica, aparentemente paradójica en la paciente, a ayuno de 24 horas es consistente con el bloqueo gluconeogénico postulado. Este estudio permitirá profundizar más acerca de la importancia que desempeña la piruvato carboxilasa en el metabolismo intermediario.

CAPITULO II
I N T R O D U C C I O N

•

El metabolismo intermediario es la suma de todas las reacciones enzimáticas celulares de biosíntesis (anabolismo) y de degradación (catabolismo) mutuamente relacionadas. El metabolismo intermediario es una actividad muy coordinada, funciona en forma integral y equilibrada intercambiando materia y energía entre la célula y el entorno. Los procesos exergónicos se acoplan a los procesos endergónicos, la eficacia de esta coordinación es una de las principales características vitales.

El catabolismo libera energía química inherente de las moléculas nutritivas complejas relativamente grandes (carbohidratos, lípidos y proteínas) provenientes del entorno o de los depósitos de reserva que se degradan a moléculas más sencillas tales como lactato, acetato, CO_2 , amoníaco o urea. El anabolismo consume la energía que deriva del catabolismo y conduce a la biosíntesis de macromoléculas de la célula como los ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos a partir de precursores sencillos.

La mayor parte de las reacciones del metabolismo intermedio involucran transferencias enzimáticas de átomos de hidrógeno, de moléculas de agua, de unidades funcionales específicas como grupos amino, acetilo, fosfato, metilo, formilo, carboxilo o adenililo. Los procesos metabólicos tanto biosintéticos como degradativos pueden ser lineales, cíclicos, ramificados, o bien, arreglos metabólicos jerárquicos en capas. Las rutas metabólicas tienen muchas etapas, de modo que las que proporcionan y las que consumen energía química se adaptan a las dimensiones de los

valores de intercambio energético habituales de la célula.

Otras reacciones bioquímicas fundamentales son los sistemas de transporte de sustratos a través de diferentes membranas celulares, así como a través de la mucosa intestinal y del epitelio del túbulo renal. Los mecanismos de transporte activo, vía proteínas transportadoras específicas, y la velocidad de entrada de nutrientes, vía permeabilidad selectiva -tamaño, solubilidad, carga de sustratos nutrientes-, constituyen sistemas básicos que regulan el metabolismo intermediario (192, 183a, 234a).

Los metabolitos intermediarios están presentes en baja concentración en el "estado estacionario celular", concentraciones óptimas que aseguran su carácter funcional. La acumulación de metabolitos solubles se debe a la presencia de inhibidores enzimáticos o a un defecto genético. El bloqueo en el flujo de metabolitos por una vía debido a un defecto en la actividad de la enzima (mutación de la actividad catalítica) o a un defecto en el transporte transmembranal de un sustrato, que se hereda en forma monogénica o mendeliana se conoce como "error innato del metabolismo". El estudio de las deficiencias enzimáticas proporciona una clave importante acerca de la naturaleza química de una ruta metabólica determinada o de alguna de sus etapas (10a, 96, 150a, 183a, 234a).

Los errores innatos del metabolismo pueden afectar las vías metabólicas de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, lipoproteínas, esteroides, purinas, pirimidinas, porfirinas, pigmentos, organometales, enzimas lisosomales, alteraciones del sistema inmu

ne, de los tejidos formadores de las células sanguíneas y aberraciones del metabolismo de las células rojas. En todos estos desordenes genéticos la anomalía primaria invariablemente reside en el control genético de la síntesis de proteínas (10a, 150a, - 234a).

CAPITULO III

O B J E T I V O S

El proyecto a desarrollar plantea como objetivo preliminar el estudio del metabolismo intermedio en humanos dando un enfoque central a las vías metabólicas incluyendo: glucólisis, gluconeogénesis, cetogénesis y ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Se pretende delinear, por vez primera, el perfil metabólico basal de niños y adultos de una población mexicana normal. Este esquema constituirá un estandar de valores normales para individuos mexicanos y servirá para estudiar las desviaciones patológicas en pacientes con errores innatos del metabolismo, así como para el descubrimiento de algunos de ellos.

El esquema detallado de valores bioquímico-clínicos se establecerá midiendo los metabolitos clave en las siguientes vías:

- a) glucolítica y gluconeogénica (glucosa, piruvato y lactato).
- b) aminoácidos gluconeogénicos primarios (alanina y glutamina).
- c) metabolitos intermedios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (α -cetoglutarato y citrato).
- d) aminoácidos relacionados en forma directa con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos ya sea como precursores anapleróticos -a través de su incorporación por vías alternas a la piruvato carboxilasa- o como derivados del ciclo (glutamato, glutamina y aspartato).

e) cuerpos cetónicos provenientes de la movilización de -- grasas vía mecanismo de β -oxidación y de la descarboxilación oxidativa del piruvato vía piruvato deshidrogenasa (β -hidroxibutirato y acetoacetato).

Como parte de esta tesis se montará la metodología para la medición de los metabolitos ya mencionados. Los ensayos se efectuarán por procedimientos enzimáticos fluorométricos dependientes de los nucleótidos de piridina: NAD^+ , NADP^+ , NADH y NADPH ; el método se basa en las características de absorbancia máxima (360 nm) y de emisión fluorescente óptima (460 nm) de las coenzimas en estado reducido, NADH y NADPH .

En este proyecto de investigación, se presentarán los estudios practicados a una paciente con deterioro neurológico severo y cuadro de acidosis láctico-pirúvica. Se intentará integrar el fenotipo clínico y bioquímico de la paciente y se evidenciará el bloqueo metabólico responsable de la hiperalaninemia, hiperpiruvicemia e hiperlactatemia características de esta aberración en el metabolismo del piruvato. Se investigará el perfil metabólico -- dinámico de la paciente mediante curvas metabólicas obtenidas después de someterla a sobrecargas con sustratos exógenos, ayunos -- prolongados y a terapias con dieta cetogénica.

El estudio de esta paciente ejemplifica un error innato -- del metabolismo y nos es útil para conocer más el metabolismo humano normal y su regulación. Nos permitirá comprender la comple-

alidad e integración de las vías metabólicas cruciales así como entender la interrelación de las mismas. También nos permitirá - - aclarar el concepto de heterogeneidad genética que presentan las enzimas que intervienen en las vías metabólicas bloqueadas y que se manifiestan como alteraciones clínicas muy diversas en un mismo defecto enzimático. Con estos estudios, es posible especular sobre la eficacia de intervenciones terapéuticas adecuadas en estos casos.

CAPITULO IV
SECCION TEORICA

En este sistema de no equilibrio la reacción preliminar A continuamente suministra x desde el entorno, en tanto que la reacción subsecuente B continuamente elimina y desde el sistema. Si la velocidad de la reacción A es constante y la velocidad de la reacción B es función de la concentración de y , la velocidad de conversión de un sustrato en otro podría ser constante y el sistema estaría en un estado-estacionario. El estado-estacionario sirve como modelo para la operación de las vías metabólicas. Las principales características de un sistema en estado-estacionario son la independencia del tiempo, de las concentraciones de los intermediarios metabólicos y la presencia de un flujo constante. Necesariamente, la constancia de flujo (velocidad de conversión de un intermediario metabólico en otro) es el principal factor que determina el estado-estacionario.

Un sistema en estado-estacionario contiene dos tipos de reacciones: una que provee (o genera) el flujo constante y otras que se ajustan al flujo respondiendo a cambios en la concentración del sustrato. La reacción "generadora de flujo" (primera reacción en la vía) está saturada con el sustrato-vía, el cual suministra el flujo de materia a través del sistema abierto. Los criterios que identifican a una reacción "generadora de flujo" incluyen el que es una reacción de no-equilibrio; la concentración del sustrato in vivo es considerablemente mayor que la constante de Michaelis (K_m) de la enzima que cataliza la reacción; y los cambios en la concentración del sustrato no causan cambios en el flujo a través de la vía. Las otras reacciones que responden a la reacción "generadora de flujo" están reguladas por cambios -

en la concentración de su sustrato vía (denominado efector interno).

La aplicación de estos criterios ha permitido establecer, por ejemplo, que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos contiene al menos dos flujos y puede presentar dos pasos "generadores de flujo" catalizados por citrato sintasa (CS) y por α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH). Estos controlan la entrada de residuos de acetyl-CoA y α -cetoglutarato, respectivamente.

Una vía metabólica generalmente presenta tres tipos de reacción:

-una única reacción de no-equilibrio que se aproxima a la saturación con el sustrato-vía (la reacción "generadora de flujo"), controla el flujo estado-estacionario. Provee direccionalmente (la acumulación del producto tiene poco o ningún efecto sobre la reacción) al inicio de la vía. No es sensible a cambios en la concentración de efectores alostéricos y a otros reguladores.

-una o más reacciones de no equilibrio no saturadas con el sustrato-vía. Proveen en forma direccional particularmente en los pasos finales o medios de una vía metabólica larga. Influyen en la magnitud de la sensibilidad de reacciones cercanas al equilibrio.

Son susceptibles a control por factores alostéricos, a inhibición "feedback" y a control hormonal vía mensajeros secundarios. Presentan baja sensibilidad a cambios en la concentración de sustrato(s) y a efectores alostéricos.

-más de una reacción cercana-al equilibrio. Son altamente sensibles a cambios en la concentración del sustrato(s) y/o del producto(s) de la reacción. Son ideales para transmitir el flujo iniciado por la reacción "generadora de flujo". Son débilmente sensibles a la regulación alostérica. No proveen sitios para control "feedback" u hormonal vía mensajeros secundarios. La sensibilidad intrínseca de una reacción cercana-al equilibrio a un cambio en la concentración de un sustrato es directamente proporcional a la reversibilidad de la reacción -definido como el cociente de la velocidad de la reacción en un sentido y el flujo total de reacción-.

La sensibilidad en el control metabólico puede definirse como una medida de la magnitud de la respuesta a un estímulo dado, por ejemplo, el cambio en el flujo a través de una vía metabólica en respuesta a un cambio en la concentración de un sustrato. Los cambios en la concentración de un sustrato y/o en un efector alostérico afectan la actividad de las enzimas (aumento o disminución de la actividad enzimática) y en consecuencia, cambian el flujo metabólico.

La inhibición o activación de enzimas alostéricas representa un mecanismo importante del control de los procesos metabólicos. Las enzimas alostéricas son oligoméricas y en general el activador (efector) o el inhibidor no conservan ninguna relación estructural con el sustrato. La inhibición por "feedback negativo" ocurre cuando el producto final actúa como regulador metabó-

lico cuando su concentración aumenta, inhibiendo la formación de sus precursores y por ende, inhibe su propia biosíntesis. Este mecanismo establece un ciclo metabólico autorregulado que permite comprender la concentración siempre constante de los intermediarios metabólicos (homeostasis).

La regulación por "feedback" presenta varios grados de complejidad y diversas variantes:

-"feedback" monovalente, si la enzima alostérica es inhibida únicamente por el producto final de una secuencia de reacciones.

-"feedback" divalente, si el camino biosintético es ramificado y ambos productos finales inhiben la misma enzima. La concentración elevada de uno de los productos finales inhibe la formación del otro producto de la vía ramificada aunque este último se encuentre en concentración normal, sin embargo, esta aparente anomalía es regulada por la funcionalidad de las isoenzimas (estas catalizan la misma reacción a diferente velocidad).

-"feedback" secuencial, si los productos finales inhiben a las enzimas que transforman al precursor común de vías metabólicas ramificadas alternas.

-"feedback" multivalente, si se controla la formación de precursores en rutas ramificadas, ambos productos finales actúan en forma concertada para inhibir la enzima reguladora inicial. Si únicamente uno de los productos se acumula, inhibirá su propia

biosíntesis pero no afecta la formación del otro producto en la vía ramificada. Una variante de este sistema es el "feedback" - acumulativo en el que los productos finales sólo inhiben parcialmente a la enzima reguladora y cuando los dos productos están -- presentes, se suman sus efectos inhibitorios.

Los factores primarios que regulan la actividad de las enzimas y por tanto influyen en la velocidad de las reacciones bioquímicas en una vía metabólica incluyen el pH, las concentraciones intracelulares del sustrato(s), producto(s) y efector(es). Diferentes vías pueden emplear de manera simultánea los mismos sustratos o cofactores de tal forma que si alguna de estas vías se incrementa, puede provocar la carencia del sustrato o cofactor común en la otra vía, este mecanismo también constituye un proceso de regulación de la actividad metabólica.

La regulación de la síntesis de enzimas y de ácidos nucleicos es básica en el control de los sistemas biológicos. La concentración óptima fisiológica de una enzima es función de su síntesis y degradación. La síntesis está regulada por represión e inducción. En la represión generalmente el producto final de una secuencia metabólica, denominado correpresor, inhibe la biosíntesis de la enzima reprimible, la cual actúa en las primeras etapas de la biosíntesis del correpresor. Este mecanismo le permite a la célula economizar recursos y no sintetizar enzimas que no sean estrictamente necesarias. En la inducción la síntesis de la enzima puede incrementarse varios miles de veces por la --

presencia del sustrato de la enzima (inductor). La síntesis de la enzima está regida por la información contenida en la región operón del DNA.

1.2. Errores Innatos del Metabolismo.

Todos los procesos bioquímicos están bajo control genético. El concepto "un gen-una enzima", redefinido por "un cistrón-un polipéptido" (cistrón es la unidad funcional de DNA que controla la estructura de una única cadena polipeptídica) establece que cada gen único controla la síntesis de una enzima y por tanto especifica una única reacción bioquímica individual. Así, una mutación en un gen único alterará exclusivamente una reacción química primaria. Este concepto cubre tanto proteínas que no son enzimas como proteínas complejas (integradas por cadenas polipeptídicas no idénticas y enlazadas de varias formas). (10a, 150a, 234a).

Los desordenes monogénicos responsables de anomalías bioquímicas o clínicas importantes presentan uno de tres patrones simples de herencia: (1) autosómica dominante, (2) autosómica recesiva o (3) ligada al X. El término dominante implica que una mutación será clínicamente manifiesta cuando el individuo tiene una dosis única de esta mutación (o es heterocigoto para ella). El modo de herencia recesivo implica que una dosis doble de mutación (u homocigosidad) es requerida para su detección clínica. Los genes responsables de los desordenes ligados al X se localizan en el cromosoma X; el riesgo clínico y la severidad de la enfermedad es mayor en el sexo femenino (con un par de cromosomas X) que

puede ser heterocigoto u homocigoto para un gen mutante (10a, -- 150a, 183a, 234a).

Más del 95% de los errores innatos del metabolismo se heredan en forma autosómica recesiva, su frecuencia es más elevada en matrimonios consanguíneos. Los heterocigotos portadores de un alelo mutante son clínicamente normales a pesar de que cada célula produce cerca del 50% del número normal de moléculas enzima activas. Por ejemplo, los heterocigotos para la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa presentan un patrón clínico asintomático debido a que el déficit de actividad enzimática es compensado por la concentración incrementada, aproximadamente dos veces, de fenilalanina (aumenta la saturación de la enzima activa residual por el sustrato) (183a, 234a).

Por otro lado, si el individuo hereda alelos afuncionales en ambos loci que especifican una enzima, la reducción de la actividad enzimática es mayor y los mecanismos de compensación no superan esta deficiencia ocurriendo manifestaciones clínicas y patológicas severas. Los homocigotos para fenilcetonuria con una reducción importante de la fenilalanina hidroxilasa, acumulan cantidades excesivas de fenilalanina que dañan en forma marcada vías metabólicas secundarias causando detrimento en el desarrollo cerebral (183a, 234a).

Las lesiones bioquímicas básicas en los desordenes monogénicos involucran defectos en una amplia variedad de proteínas, in

cluyendo enzimas, receptores, proteínas de transporte, hormonas - peptídicas, inmunoglobulinas, colágenas y factores de coagulación. La mayoría de los desordenes monogénicos cuyas bases bioquímicas han sido definidas corresponden a la actividad deficiente de una enzima específica. En otros desordenes metabólicos se sintetiza una cantidad normal de proteína pero mutada estructuralmente -- (10a, 150a, 234a).

Como ejemplos de enzimas con actividad deficiente, demostrada en humanos, que causan desordenes metabólicos citaremos -- las siguientes: catalasa, acetil-CoA carboxilasa, tirosinasa, -- oxidasa del ácido homogentísico, arginasa, piruvato descarboxilasa, sintetasa del ácido arginosuccínico, lactasa, galactosa-1-- fosfato uridil-transferasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glu-- cosa-6-fosfatasa, fructosa-1-fosfato aldolasa, fructocinasa hepá-- tica, fosforilasa hepática, fosfofructocinasa muscular, hexocina-- sa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, glutatión reductasa, fosfo-- glicerato cinasa, piruvato cinasa, β -metilcrotonil-CoA carboxila-- sa, carbamilfosfato sintetasa, ornitina transcarbamilasa, fruc-- tosa-1,6-- difosfatasa, ácido isovalérico-CoA deshidrogenasa, pi-- ruvato carboxilasa, hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa, dihidrolipoil deshidrogenasa, cetoácido descarboxilasa, fenilala-- nina hidroxilasa, propionil-CoA carboxilasa, p-hidroxifenilpiru-- vato oxidasa, lipasa ácida, xantina oxidasa, etc. (10a, 150a, - 234a).

Una mutación en la actividad enzimática ocasiona afinidad

reducida por el sustrato específico, la acumulación consecuente del sustrato y la formación incipiente del producto(s) final(es) de la vía bloqueada. Es posible que vías metabólicas colaterales incrementen su flujo influenciadas por la concentración excesiva de metabolitos de la vía afectada por la mutación o bien que ésta pueda modificar la actividad de otras enzimas pertenecientes a -- vías metabólicas diferentes (150a, 183a, 234a).

Los métodos de análisis apropiados para el estudio de un defecto enzimático son los de enzimología. La elucidación genética de un defecto enzimático en los errores innatos del metabolismo requiere de valores cuantitativos de la actividad enzimática y pueden examinarse diferencias cualitativas en las características de la enzima (inestabilidad, termo-resistencia, movilidad electroforética alterada, propiedades inmunológicas, exámenes de la actividad enzimática en células somáticas in vitro). Las enzimas pueden ser ensayadas en sus propiedades cinéticas, ejemplos: diferente K_m , respuesta alterada a sustratos o cofactores, sensibilidad modificada a inhibidores (10a, 150a, 234a).

Un ejemplo de error innato del metabolismo que se hereda en forma autosómica recesiva es el caso clínico que se estudia en esta tesis, un defecto de actividad deficiente de tres enzimas -- mitocondriales que responden a biotina. La paciente estudiada -- presenta acidosis láctico-pirúvica debido a la actividad deficiente de las carboxilasas de piruvato, propionil-CoA y β -metilcrotonil-CoA, enzimas que requieren de biotina como cofactor. El --

diagnóstico de deficiencia múltiple de carboxilasas fue confirmado al demostrar una actividad baja de éstas en linfocitos de sangre periférica y en fibroblastos en cultivo derivados de la paciente (González-Noriega, A., Ortiz, R. y Velázquez, A. Manuscrito en preparación).

La paciente respondía clínica y bioquímicamente a terapia con dosis farmacológicas de biotina (dosis más de mil veces mayor que el mínimo diario requerido). Se ha demostrado que el defecto primario es una deficiencia en la sintetasa de holocarboxilasa mitocondrial (González-Noriega, A., Ortiz, R. y Velázquez, A. Manuscrito en preparación). La holocarboxilasa sintetasa común une covalentemente biotina a las varias apocarboxilasas inactivas para formar la holoenzima activa (holocarboxilasa activa) (59, 75, 174, 191, 205). Las anormalidades bioquímicas características de este desorden genético incluyen acidosis láctica pirúvica, excreción urinaria incrementada de 3-metilcrotonil glicina, ácido 3-metilcrotonico, ácido 3-hidroxi-isovalérico, ácido 3-hidroxi-propiónico y ácido 3-metil-cítrico (7, 8, 59, 156, 176, 217).

La propionil-CoA carboxilasa participa en el metabolismo de isoleucina, valina, ácidos grasos de cadena larga, treonina y metionina. La β -metilcrotonil-CoA carboxilasa es importante en la degradación de leucina. La piruvato carboxilasa es una importante enzima gluconeogénica, participa como enzima anaplerótica en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, contribuye con el metabolismo lipogénico y cetogénico (7, 8, 59, 75, 155, 172).

En la paciente, la reactivación de la enzima mutante deficiente, piruvato carboxilasa, se logró incrementando la poza intracelular de acetil-CoA mediante procedimientos de ayuno prolongado o bien por terapias con dietas cetogénicas. Esto se debe a la activación de la carboxilasa pirúvica por acetil-CoA, efector crítico de la enzima, y especialmente al aumento en la biotinización de la apocarboxilasa en la cual el acetil-CoA desempeña una importante función. Este mecanismo se ha descrito previamente en Bacillus termophilus y en levaduras (29,222).

1.3. Fundamento teórico de las técnicas microfluorométricas enzimáticas.

Como parte de esta tesis se montará la metodología para la medición de los metabolitos siguientes: glucosa, piruvato, lactato, alanina, β -hidroxibutirato, acetoacetato, citrato, α -cetoglutarato, glutamina, glutamato y aspartato. Se manejarán procedimientos microenzimáticos que emplean la fluorescencia nativa de los piridín nucleótidos NADH y NADPH. Una amplia variedad de sistemas enzimáticos específicos puede acoplarse a la oxidación de NADH o NADPH o bien a la reducción de NAD^+ y NADP^+ . Con la enzima apropiada como catalizador ocurre la oxido-reducción selectiva de un sustrato particular aún en presencia de innumerables compuestos (15a, 15b, 62, 99a).

En solución acuosa suficientemente diluída los piridín nucleótidos NAD^+ y NADP^+ tienen una excitación máxima en la región del ultravioleta cercano a 260 nm. Las formas reducidas NADH y

NADPH tienen una excitación adicional a 340 nm. Estas últimas -- son fluorescentes y las formas oxidadas no lo son. La fluorescencia de las moléculas de NADH y NADPH resulta de la transferencia de energía desde el anillo piridínico (grupo funcional) a la porción dihidro-nicotinamida sustituida del nucleótido oxidado (hidrogenación en la posición 4) produciendo una emisión fluorescente óptima a 460 nm en la región visible del espectro (15b, 99, 121a, 194).

En solución pura altamente diluida el NADH y NADPH presentan igual espectro de absorción, espectros fluorescentes idénticos en posición y magnitud y la misma intensidad fluorescente. La fluorescencia emitida, medida en función de la frecuencia de luz incidente en quantos de intensidad constante, es proporcional al producto del quantum fluorescente (θ) y el coeficiente decádico de absortividad molar (ξ) de la sustancia fluorescente. Para propósitos prácticos el valor de ξ para NADH y NADPH equivale a $6.3 \times 10^2 \times \text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$ (73, 137, 201, 121a).

La sensibilidad límite teórica de la medición fluorométrica de los nucleótidos de piridina oxidados o reducidos es del orden de 10^{-9} - 10^{-15} molas. Este último nivel es de utilidad analítica fundamentalmente en métodos de ciclación enzimática. Los límites de sensibilidad práctica corresponden a 10^{-8} - 10^{-12} molas. En la metodología para la cuantificación de los metabolitos propósito de esta tesis se emplea una amplitud de 0.1 - $10 \mu\text{M}$ (0.1 - 10×10^{-9} molas) de NADH y NADPH o bien de NAD^+ y NADP^+ en un volumen

final de 1.0 ml en la mezcla de reacción. En contraste, en espectrofotometría el límite de sensibilidad útil para la cuantificación de NADH y NADPH es del orden de 10^{-5} - 10^{-9} moles (99, 99a, 99b, -137).

La elevada sensibilidad del método fluorométrico resulta de la elección de dos longitudes de onda; una λ óptima de excitación y una λ óptima de emisión fluorescente. Ocurre por tanto un grado extra de libertad en relación con la espectrofotometría la cual emplea solamente una longitud de absorción. Para una amplia variedad de compuestos la región espectral entre los picos de excitación y de emisión puede ser tan pequeña como 10 nm o tan grande como 250 nm. Algunos compuestos pueden absorber en la misma λ pero no siempre presentan la misma λ de emisión fluorescente (62, 63, 194, 239).

La medición fluorométrica no siempre se realiza en el pico espectral o en la región relativamente plana de la curva espectral como se requiere en espectrofotometría. En consecuencia, en fluorometría pueden evadirse compuestos interferentes empleando longitudes de onda alejadas de la activación o emisión máximas (73, 137, 194).

En fluorometría se mide directamente la radiación emitida y esta puede ser aumentada o disminuida modificando la intensidad de la energía radiante de excitación. En cambio, en espectrofotometría la radiación absorbida se mide en forma indirecta

como la diferencia, relativamente pequeña, entre el haz incidente de referencia 100% y la luz transmitida por la molécula absorbente. Un decremento pequeño en la intensidad de una señal muy grande reduce la sensibilidad del método espectrofotométrico. Este método pierde adecuación cuando la señal de la muestra se aproxima a la señal de referencia. En la práctica la precisión del ensayo fluorométrico se aproxima a 0.5-1.0% (62, 63, 134, 194).

En fluorometría el fotodetector registra diferencias relativamente grandes de la energía de emisión fluorescente generada por la propia muestra contra un "background" (fluorescencia de solvente, fluorescencia de la cubeta, emisión Raman, dispersión de la luz incidente) virtualmente de "cero". La lectura de la muestra puede ajustarse a 100% controlando la intensidad de la fuente de radiación y la amplificación del selector (99, 179, 194, 239).

En virtud de la elevada selectividad y sensibilidad de las mediciones fluorométricas estas tienen un uso amplio en el análisis cuantitativo de cantidades traza (concentraciones mínimas) de compuestos de interés biológico. Por estos métodos es factible ensayar micromuestras, muestras biológicas muy pequeñas, empleando un volumen de mezcla reactiva normal y coenzimas suficientemente diluidas (99a, 99c, 201).

El método enzimático implica elevada especificidad de la enzima adecuada por un sustrato particular aún en presencia de --

una mezcla de sustancias interferentes. La exactitud del ensayo enzimático es elevada debido precisamente a la marcada especificidad de la enzima por su sustrato en el sistema analítico. Sin embargo, la precisión del método enzimático depende de la complejidad del sistema de ensayo. Por ejemplo, los sistemas que miden diversos metabolitos por reacciones en el punto final son más precisos que los métodos que cuantifican la actividad catalítica de la enzimas (15a, 15b, 63a).

Todas las reacciones que involucran coenzimas son de dos sustratos. Sin embargo, pueden ser tratadas cinéticamente como reacciones de un sustrato si uno de ellos está presente en muy elevada concentración en relación con su K_m . El aumento en la concentración de las coenzimas NADH y NADPH está limitado por su absorbancia. Las reacciones enzimáticas involucradas en esta tesis proceden como reacciones de punto final empleando cantidades relativamente elevadas de enzima y niveles relativamente pequeños de sustrato(s). La reacción procede rápidamente hasta completarse (15b, 63a).

La oxidación o reducción del nucleótido (NAD^+ , $NAPD^+$ o bien NADH, NADPH) es estequiométrica, acoplada a la oxido-reducción selectiva y específica del sustrato particular y en presencia de la enzima adecuada que actúa como catalizador (15a, 15b, 63a).

2. GLUCOSA

La sangre circulante únicamente contiene como azúcares sencillos glucosa y pequeñas cantidades de fructosa (96, 118). La fuente continua de glucosa en sangre, procede de la hidrólisis de glucosa-6-fosfato en el hígado, riñón e intestino que presentan la glucosa-6-fosfatasa específica microsomal. La glucosa-6-fosfato deriva de glucogenolisis o de otros precursores potenciales (118, 192). El glucógeno muscular no es accesible para la producción directa de glucosa, ya que la glucosa-6-fosfatasa está ausente en el músculo (118, 154). La concentración de glucosa en sangre depende de la velocidad relativa de producción (a partir de glucógeno, aminoácidos y otras fuentes); de la capacidad de absorción de glucosa en conducto intestinal; de su utilización por tejidos glucosa-dependientes y de su excreción y pérdida en orina (40, 118, 192).

La velocidad de utilización está determinada por la concentración de glucosa en los compartimientos extracelulares; si los niveles de glucosa son elevados ocurre una óptima asimilación por los tejidos incluyendo el músculo e hígado. En hiperglicemia de diabetes mellitus aumenta la captación de glucosa por cerebro y miocardio; en contraste, hígado y músculo son incapaces de tener una nutrición normal (estado descrito adecuadamente como "inanición en medio de la abundancia"). En hiperinsulinismo causado por hiperplasia o neoplasia de las células β (en los islotes de Langerhans) o bien después de inyección de insulina se incremen

ta la asimilación de glucosa por el músculo y disminuye la absorción por el sistema nervioso central (51, 192)

El etanol induce hipoglicemia, inhibe la producción de glucosa (en un 35% aproximadamente). Se incrementa la relación $[\text{NADH}] / [\text{NAD}^+]$, equilibrio oxido-reductor catalizado por la alcohol deshidrogenasa. Aumentan los pares redox [lactato]/[piruvato] (de 20 a 76) y $[\beta\text{-hidroxibutirato}]/[\text{acetoacetato}]$ (de 3 a 8) que reflejan el estado redox citoplasmático y mitocondrial, respectivamente. Resultan inhibidas la conversión de glicerofosfato a dihidroxiacetona fosfato y la gluconeogénesis a partir de piruvato (por derivación de éste a lactato) y a partir de alanina (23, 92).

Los eritrocitos, leucocitos, la médula ósea y renal, los nervios periféricos y probablemente en menor extensión el músculo (esquelético y cardíaco) metabolizan glucosa hasta lactato (y piruvato). Estas moléculas son transportadas a hígado y riñón (corteza renal), vía circulación sanguínea, donde pueden ser reconvertidas a glucosa "ciclo de Cori". Los valores de reciclación varían de 27-58 g/día (requerimientos metabólicos basales) y parecen no estar relacionados al "Status" nutricional del individuo. Los valores no cambian en condiciones de ayuno o en estado de postabsorción (26, 27, 133, 154). En condiciones metabólicas basales el consumo de glucosa por sistema nervioso central, cerebro, eritrocitos y leucocitos equivale a 180 g/día, consumo que incluye los requerimientos energéticos mínimos de otros sistemas glicolizantes (26, 97, 133, 154, 166). En ayuno breve, cerca de 36 g (20%) de la

glucosa utilizada diariamente es catabolizada vía glucólisis anaeróbica y reciclada a glucosa (27, 154, 166).

La glucosa se almacena como glucógeno (energía química potencial) en diversos tejidos incluyendo las células del tejido adiposo, pero en proporción importante en hígado y en músculo esquelético. Son sustratos glucogénicos: las hexosas (glucosa, galactosa y fructosa); los aminoácidos (alanina, aspartato, glutamato, arginina, cisteína, glicina, histidina, hidroxiprolina, metionina, prolina, serina, treonina, triptofano, valina, isoleucina, lisina, fenilalanina y tirosina); la glicerina y glicerol; y productos intermediarios de la glucólisis. Todos los sustratos glucogénicos deben convertirse primeramente a UDP-glucosa vía glucosa-6-fosfato y glucosa-1-fosfato (41, 154, 192).

En inanición, el suministro continuo de glucosa sanguínea es esencial para mantener la homeostasis energética y de glucosa. En ayuno de 48 horas se depleta casi completamente el glucógeno hepático y la velocidad de producción de glucosa depende directamente de la accesibilidad de sustratos gluconeogénicos (1, 23, 27, 84, 150, 154). La gluconeogénesis involucra la conversión de aminoácidos y la reciclación de esqueletos carbonados derivados de glucosa (lactato, piruvato, glicerol) a glucosa. El metabolismo oxidativo de los ácidos grasos (incrementado) soporta la síntesis de glucosa a partir de lactato (producto glucolítico). El efecto neto del "ciclo de Cori" es el inicio de la lanzadera energética

y la economía de gluconeogénesis, a partir de proteínas, limitando la oxidación completa de glucosa a CO_2 (1, 26, 27, 42, 188).

En individuos adultos sujetos a periodos prolongados de inanición, la velocidad de producción total de glucosa es mantenida por la oxidación de glucógeno (cuantifica con 7% de la producción total); por los aminoácidos que derivan de proteólisis (dan cuenta de 21% aproximadamente); el glicerol (cuantifica con 20%); lactato, piruvato y alanina -derivados de glucosa y reciclados vía gluconeogénesis- contribuyen en forma mínima. Del total de glucosa accesible para oxidación casi 5% es reciclada a lactato y 20% a piruvato o alanina. La oxidación de glucosa a CO_2 y H_2O , y los mecanismos de reciclación proveen no más de 10% y menos de 2%, respectivamente, de los requerimientos energéticos durante inanición (27, 42, 84, 154). Si estuviese limitada la capacidad de adaptación metabólica al cambio de un estado alimentado a uno de ayuno, se desarrollaría hipoglicemia (64, 65). La hipoglicemia en ayuno se observa con mayor frecuencia en niños que en adultos; en el niño ocurre una rápida depleción de glucógeno, este se oxida totalmente en un lapso de 24-36 horas de ayuno (65, 70, 84, 143). La hipoglicemia es más común en niños desnutridos (71, 84, 143). La velocidad de producción de glucosa en condiciones de inanición de dos diferentes estados nutricionales -desnutrición y recuperación- es similar a pesar de la gran diferencia en la accesibilidad de sustratos gluconeogénicos (cuantifican con el 9% y 21% de la producción total esplánica de glucosa, respectivamente). Sin embargo, no hay evidencias de que exista una diferencia significa

tiva en la capacidad gluconeogénica de ambos grupos (65, 70, 71, 84). En niños normales después de restricción calórica, 12 - 24 horas, muestran bajos niveles de glucosa en plasma e incremento de cuerpos cetónicos sanguíneos. Esta relación inversa refleja la transición desde una fase en que la glucosa es la fuente energética predominante a una situación en que los sustratos derivados de lípidos, ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos desempeñan un papel importante (20, 84, 168).

En estado de ayuno la fase natriurética se caracteriza por la resistencia a mineralocorticoides exógenos y está aparentemente relacionada con la ingesta de carbohidratos. En individuos -- con dietas isocalóricas libres de carbohidratos se induce natriuresis similar a la producida por ayuno. La retención prominente de sodio (Na^+) que acompaña a la realimentación no ocurre si la -- dieta consiste únicamente en aporte de grasas y es lenta si la -- dieta suministra exclusivamente proteínas. El glucagon parece -- estar involucrado en estos mecanismos fisiológicos. La infusión de glucagon bloquea el efecto antinatriurético de los carbohidratos (21, 133, 154).

Pacientes adultos en estado postoperativo presentan aumento de glucosa en sangre acoplada con una reducción de tolerancia a glucosa. Los niveles de glucosa permanecen elevados por varios días. En el postoperativo el neonato normaliza la concentración de glucosa en el transcurso de 12 horas (40, 56, 79).

Los niños normales recién nacidos tienen baja capacidad de depuración de glucosa (administración I.V.) durante las primeras 24 horas de vida. La tolerancia a glucosa aumenta con la edad y en 5-7 días la velocidad de depuración se aproxima a la unidad. Se cree que la glucosa de origen materno sea la fuente primaria de energía para el desarrollo del feto; la glucosa pasa por difusión facilitada a través de la placenta (40, 56, 140). Esta glucosa se emplea en el metabolismo oxidativo energético y para proveer sustratos para la biosíntesis de glucógeno y grasas. En embarazo normal hay una relación cerrada entre la concentración de glucosa materna y fetal; en estado de ayuno ocurre una diferencia significativa de 6 mg/100 ml. En embarazo diabético la diferencia es alrededor de 40 mg/100 ml (40, 56, 140).

El metabolismo de carbohidratos responde dinámicamente durante la evolución de un proceso infeccioso. Opera interrelacionándose a los efectos de otros factores incluyendo: hormonas gluco-regulatorias; accesibilidad de carbohidratos exógenos en la dieta; administración parenteral de carbohidratos; depósitos de glucógeno en los tejidos; accesibilidad hepática de lactato, piruvato, glicerol y aminoácidos gluconeogénicos; y el "status" nutricional del organismo respecto a proteínas, lípidos, vitaminas y minerales disponibles. La utilización de glucosa en infección depende también de la integridad de los mecanismos enzimáticos gluconeogénicos en hígado y de la capacidad de las células periféricas para captar y metabolizar glucosa. Todos estos factores pueden estar influenciados por infecciones específicas de diferentes

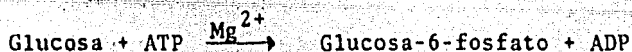
tipos, dependiendo de la evolución de la infección y de sus complicaciones. Los mecanismos hipermetabólicos generados durante un proceso infeccioso involucran: el incremento en la velocidad proteolítica (en músculo esquelético); aumento del flujo gluconeogénico a hígado (aumenta la extracción fraccional de alanina y disminuye la concentración plasmática de ésta); ocurre glucogenólisis acelerada (11, 13, 32, 141).

La insulina es el regulador primario de la homeostasis energética periférica. La secreción de la hormona por las células β del páncreas es extraordinariamente sensible a cambios mínimos en la concentración de glucosa sanguínea, respondiendo con elevada rapidez (26, 27, 133). En ayuno, la concentración mínima de insulina excretada puede modular la liberación de sustratos gluconeogénicos y la extracción fraccional hepática de los mismos, así también regula la entrada de glucosa en el torrente sanguíneo (26, 27, 133). Fisiológicamente la insulina regula la salida de glucosa a la sangre (51, 118, 192). La insulina incrementa la velocidad de transferencia de glucosa desde el compartimiento extracelular al intracelular (51, 118, 192), aumenta la síntesis de glucógeno muscular y de ácidos grasos en hígado y tejido adiposo (51, 118, 192). Se considera que la insulina actúa primeramente en las células no hepáticas (tejido periférico) para asegurar el transporte de glucosa, aminoácidos y otros iones a través de la membrana plasmática, pero inhibe a la lipasa hormona-sensible del tejido adiposo tal que la movilización de los ácidos grasos es dañada y en cambio se estimula la síntesis de proteínas, grasas y

glucógeno (27, 51, 118, 192). La insulina causa hipoglicemia in vivo, vía reducción de la secreción de la hormona glucagon, en consecuencia resulta disminuida la gluconeogénesis hepática (23, 27). Por estudios de cateterización de la vena portal se ha evidenciado que la insulina inhibe la extracción fraccional hepática de lactato, alanina y glicerol (23, 27, 133). In vitro estimula la captación de glucosa por tejidos sensibles. Las hormonas glucagon y epinefrina ejercen un efecto glucogenolítico en hígado y músculo, provocan hiperglicemia. La somatotropina, hormona del crecimiento y la adrenocorticotropina antagonizan la acción de la insulina produciendo incremento en los niveles de glucosa en sangre. Los glucocorticoides son agentes hiperglicémicos; incrementan gluconeogénesis (vía estimulación de proteólisis muscular y activación de las aminotransferasas hepáticas) e inhiben la utilización de glucosa por tejidos extrahepáticos (23, 27, 28, 45). Las catecolaminas, vasopresina y fenilefrina son agonistas de la acción glucogenolítica del glucagon, inhiben la glucógeno sintetasa (96). La adrenalina estimula glucogenolisis en músculo (produciendo lactato) y en hígado (liberando glucosa a la circulación). La hormona tiroidea (tirosina, triyodotironina) tiene un efecto diabotogénico; en hipertiroidismo ocurre hiperglicemia y en hipotiroidismo la glucosa en sangre disminuye (96, 118, 192). Esteroides corticoadrenales como el cortisol estimulan gluconeogénesis, a partir de aminoácidos, inducen glucogenosis y limitan la utilización periférica de glucosa -en músculo, tejido adiposo y linfoides- (96, 118, 192).

La glucosa se incorpora al metabolismo intermediario por -

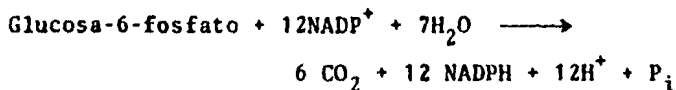
un proceso bioquímico fundamental: la fosforilación a glucosa-6-fosfato, reacción catalizada por la enzima hexocinasa. La enzima está ampliamente distribuída en hígado, músculo y tejido adiposo (96, 118, 192). Su actividad catalítica no depende de los niveles de insulina. La concentración aumentada de glucosa-6-fosfato modula la actividad de la enzima por un mecanismo de retroinhibición (96, 118). La enzima fosforila otras hexosas o derivados de hexosas (fructosa, manosa, glucosamina) (118, 192).



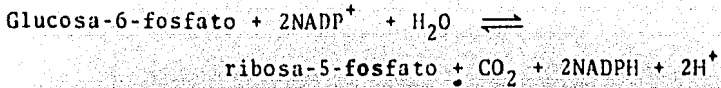
La enzima glucocinasa es específica para fosforilar únicamente glucosa. Está presente, en niveles mínimos, exclusivamente en tejido hepático y es pobremente activa en diabetes o después de ayuno prolongado. La concentración aumentada de glucosa en la circulación portal regula su actividad catalítica. Su elevado valor de K_m supone la presencia de elevadas concentraciones de glucosa-6-P antes de que llegue a saturarse la enzima (96, 118, 192). Su contribución al equilibrio homeostático de glucosa se ve reducida, en forma drástica, si la glucosa cae. Ocurrre entonces un breve periodo hipoglicémico provocado por los efectos residuales de la insulina y de la glucocinasa (96, 118). Si el estado normoglicémico se ha establecido, la hexocinasa (de mayor afinidad a -- glucosa) asume la fosforilación de glucosa a medida que ésta entra a la célula (96, 118, 192). En el hígado, la velocidad de fosforilación de las hexosas determina la velocidad metabólica máxima de la glucosa (118, 192).

La glucosa-6-fosfato sigue por varios procesos metabólicos alternativos. La desfosforilación, catalizada por la enzima glucosa-6-fosfatasa, regenera glucosa libre (118, 192). Solamente las células hepáticas, renales e intestinales hidrolizan glucosa-6-fosfato, contribuyendo a los niveles sistémicos de glucosa (96, 118, 192). Cuando disminuye la asimilación de glucosa por músculo y otras membranas celulares, aumenta la actividad de las enzimas gluconeogénicas (piruvato carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y fructosa 1,6-difosfatasa) incrementándose por ende la gluconeogénesis (228, 229). Al mismo tiempo, las hormonas adrenocorticales (hormona adrenocorticotrópica, ACTH, corticotropina) estimulan la actividad de los microsomas hepáticos, aumenta la producción de piruvato (precursor directo de la glucosa-6-fosfato) promoviéndose la hidrólisis de glucosa-6-fosfato y la liberación de glucosa libre (227, 229). La actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa aumenta en estados de diabetes, en inanición y después de la administración de esteroides corticoadrenales (96, 118, 192). La glucosa-6-fosfato se convierte a glucosa-1-fosfato, equilibrio reversible catalizado por fosfoglucomutasa; constituye la etapa inicial en la síntesis de nucleósido-difosfato-ésteres (adenosina, guanosina, uridina, timidina) a partir de glucosa. Estos se utilizan a su vez para la síntesis de difosfato-azúcares (galactosa, galactosamina, ácido glucurónico, ácido idurónico, rramnosa y fucosa) y son precursores para la síntesis de polisacáridos (96, 192). La otra vía metabólica disponible para el catabolismo de glucosa-6-fosfato es la ruta de las pentosas-fosfato; consiste en la deshidrogenación enzimática de la glucosa-

6-fosfato a 6-fosfogluconato. La vía oxidativa de 6-fosfogluconato representa un medio para la oxidación total de glucosa, independiente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; no constituye una vía predominante para la obtención de energía generada por el metabolismo oxidativo de la glucosa. Fundamentalmente esta ruta genera potencial de reducción extramitocondrial en forma de NADPH; esta función es relevante en tejidos -hígado, glándula mamaria y corteza adrenal- que realizan activamente la síntesis reductora de ácidos grasos y esteroides (a partir de acetyl-CoA) (96, 118, 145). El músculo esquelético carece virtualmente de esta vía. La oxidación de 6-fosfogluconato es importante para la conversión de hexosas en pentosas, particularmente en la ribosa-5-fosfato (molécula necesaria para la biosíntesis de ácidos nucleicos) (96, 118, 145, 192). Es un mecanismo clave de la función oxidativa -- completa de las pentosas, mediante su conversión en hexosas, ingresando de esta manera a las vías glucolítica y ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En la glándula mamaria durante el periodo de lactancia prevalece la ruta oxidativa completa que conduce exclusivamente al NADPH (96, 118, 145, 192), la ecuación global es:



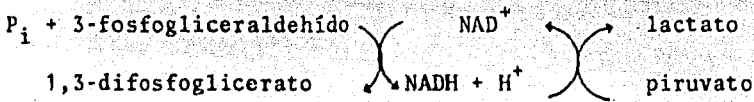
En algunas condiciones metabólicas los productos finales de la ruta de fosfogluconato son la ribosa-5-fosfato y NADPH. Las enzimas (en espacio extramitocondrial) involucradas en esta secuencia son: la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la ribosa-fosfato-isomerasa. La ecuación global puede representarse como:



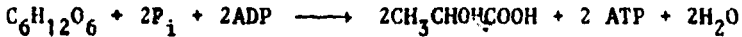
En otras circunstancias la ribosa-5-fosfato experimenta -- una serie de transformaciones catalizadas por las enzimas inclu-- yendo la ribulosa-fosfato-3-epimerasa, transcetolasa y la transaldo-- lasa. Las enzimas transcetolasa y transaldolasa participan en la conversi3n de las pentosas en hexosas y hacen posible (acci3n - - coordinada con las enzimas de la secuencia glucol3tica) la inter-- conversi3n de az3cares de 3, 4, 5, 6 y 7 3tomos de carbono por -- transferencia reversible de fragmentos de 2 y 3 3tomos de carbono (glicolaldeh3do y dihidroxiacetona, respectivamente) (96, 118, 145 y 192). Se ha postulado que las velocidades de reacci3n de gluco-- sa 6-fosfato deshidrogenasa y de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (estimadas en funci3n de los niveles de glucosa-6-P y 6-fosfoglu-- conato) controlan el flujo de carbono de hexosas al ciclo fosfa-- tos de pentosa (96, 145). La velocidad de ambas reacciones es se-- veramente limitada por la concentraci3n m3xima efectiva de NADP^+ y el cociente $\text{NADPH}, \text{H}^+ / \text{NADP}^+$ citoplasm3ticos (145, 192). La -- direcci3n hacia el flujo de pentosa es regulada a nivel fisiol3gi-- co por la condici3n glucol3tica imperante debido a que la glucosa 6-P es un sustrato com3n para ambas v3as (118, 145). La ruta fos-- fatos de pentosa es importante para la funci3n metab3lica del adi-- pocito y para la viabilidad de los eritrocitos. En estos el aporte de NADPH soporta la reducci3n de la Hb-M (Fe^{3+}) y del glutati3n (96, 118, 145).

La secuencia multienzim3tica que cataliza la oxidaci3n par--

cial de glucosa-6-fosfato a lactato incluye las enzimas: glucosa-fosfato-isomerasa, 6-fosfofructocinasa, fructosa-difosfato-aldolasa, triosa-fosfato-isomerasa, 3-fosfogliceraldehído deshidrogenasa, fosfogliceratocinasa, enolasa, piruvato cinasa y lactato -- deshidrogenasa. Dos reacciones de esta vía mantienen una relación acoplada, a través del sistema oxidorreductor NADH/NAD^+ , y son -- los equilibrios lactato deshidrogenasa y fosfogliceraldehído deshidrogenasa. La reoxidación de NADH por lactato deshidrogenasa -- permite el flujo continuo de glucosa-6-fosfato por esta vía (36, 96, 118, 192).



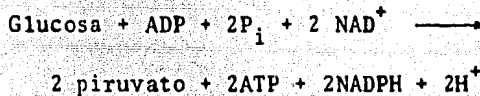
La conversión de glucosa a lactato es esencialmente irreversible, la reacción global se representa como sigue:



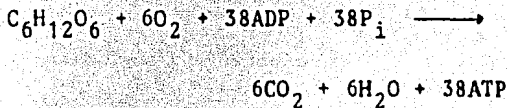
En diferentes condiciones de "stress" fisiológico, cuando la demanda energética es sustancial -por ejemplo en ejercicio ex-- tenuante o bien en hiperventilación de encefalitis, casos en que la velocidad de oxigenación celular es deficiente- ocurre un desa-- coplamiento entre las reacciones oxidativas, a través del par re-- dox NADH/NAD^+ , y el sistema de citocromos. Aumentan los cocien-- tes NADH/NAD^+ , lactato/piruvato y disminuye el pH sistémico; ocu-- rre hiperventilación y agotamiento (36, 118, 192).

La eficiencia del flujo oxidativo parcial de glucosa en los eritrocitos es casi del 53%; en músculo la recuperación energética es aún mayor (96, 192).

La energía química potencial de glucosa deriva de su oxidación completa a CO_2 y H_2O , a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos (se incorpora como acetyl-CoA, vía descarboxilación oxidativa de piruvato por PDHC) y fosforilación oxidativa asociada (96, 118, 192). La ecuación global del proceso degradativo de glucosa hasta piruvato se expresa como sigue:



La ecuación global de oxidación completa de glucosa es:



El metabolismo oxidativo total de glucosa da una eficiencia del orden de 45%, se producen 686 Kcal potencialmente disponibles. La recuperación energética por oxidación parcial de glucosa representa aproximadamente el 8% de esta energía (96, 118, 157, 192).

El glucógeno, macromoléculas de unidades de glucosa en enlaces α -1,4 y α -1,6 glucosílicos, conforma el depósito de glucosa en el hepatocito y en las células musculares (26, 27, 45). El

glucógeno ejerce una presión osmótica mínima y es potencialmente degradable (26, 27, 45). La ruptura y la síntesis de glucógeno - tienen lugar en los extremos no reductores del polímero (118). El paso limitante de la síntesis y del rompimiento de glucógeno - en el hígado es catalizado por las enzimas glucógeno sintetasa y la glucógeno fosforilasa, respectivamente (96, 118). La activi-- dad de cada una de estas enzimas está regulada por un equilibrio cinasa-fosfatasa específico que controla la interconversión de -- las formas activas (defosfo-enzima, a) e inactivas (fosfo-enzimas, b) (96, 118, 192). La glucógeno sintetasa cataliza la transferencia irreversible de residuos glucosilos a partir de UDPG formando enlaces (1 → 4) α-glucosídicos (96, 118, 192). Es totalmente -- activa en las condiciones iónicas que prevalecen en el hepatocito. Los niveles relativamente elevados de glucosa-6-fosfato y de ci-- trato activan a la glucógeno sintetasa b (118, 192). La enzima - ramificadora, oligo-(α-1,4 → α-1,6)-glucantransferasa, transfiere segmentos (de longitud aproximada de 7 unidades de glucosa) -- de una cadena a un residuo glucosilo en otra cadena de la molécula de glucógeno. Se forma un enlace (1 → 6) - α-D-glucosídico (un nuevo punto de ramificación) (96, 118). La enzima glucógeno fosforilasa cataliza la eliminación, por fosfato inorgánico, de - un residuo de glucosa en forma de glucosa-1-fosfato. La cadena de glucógeno resultante presenta una unidad de glucosa menos (96, 118, 192). La glucógeno fosforilasa es estimulada por AMP, - -

$$(\text{Glucosa})_n + \text{HPO}_4^{2-} \rightleftharpoons (\text{glucosa})_{n-1} + \text{glucosa-1-fosfato}$$

via aumento de la afinidad de la fosforilasa b para glu-

cosa-1-P (118, 192). La enzima es inhibida por glucosa, vía disminución de la afinidad para glucosa-1-P (96, 192). El glucógeno estimula a la fosforilasa cinasa e inhibe a la fosforilasa fosfatasa del hepatocito (96, 118, 192). La actividad de la glucógeno fosforilasa hepática aumenta, posiblemente por retroalimentación, concomitante al aumento de los requerimientos de glucosa por el músculo en ejercicio (96, 192). La enzima es estimulada por adrenalina y glucagon (27, 118, 138). La insulina la desactiva (118, 192).

La enzima oligo-(α -1,4 \rightarrow α -1,4)-glucantransferasa, - - transfiere un segmento formado por todas las unidades glucosilomenos una de la cadena residual (unida a un residuo glucosilo en posición 6) a otra cadena (118). La enzima amilo-1,6-glucosidasa hidroliza las unidades simples (los puntos de ramificación del glucógeno original) a glucosa (118, 192).

La biosíntesis de glucosa a partir de precursores no glucosídicos, está regulada fundamentalmente por 4 enzimas clave: la PC, la PEPCK, la fructosa 1,6-difosfatasa y la glucosa-6-fosfatasa (36, 118, 188). Los cocientes $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$; $\text{NADP}^+/\text{NADPH}, \text{H}^+$; - ATP/ADP ; acetil-CoA/CoASH y los niveles de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, son sistemas reguladores importantes del metabolismo gluconeogénico (36, 188). La insulina neutraliza la biosíntesis de las cuatro enzimas y el cortisol induce su síntesis de novo (138, 188). La gluconeogénesis involucra la formación intramitocondrial de oxalacetato (de 4 carbonos) vía PC

(24, 26, 36, 78). Dependiendo del potencial redox citoplasmático, el oxalacetato cruza la membrana mitocondrial como aspartato (si la relación $\text{NADH,H}^+ / \text{NAD}^+$ \uparrow) y como malato (si la relación $\text{NADH,H}^+ / \text{NAD}^+$ \downarrow). Los equilibrios aspartato aminotransferasa (AAT) y malato deshidrogenasa (MDH- NAD^+ dependiente) transforman al aspartato y malato, respectivamente, a oxalacetato en el citosol (23, 36, 42, 188). La conversión de fosfoenolpiruvato (formado desde oxalacetato) a fructosa 1,6-difosfato se produce por la inversión de la secuencia catalizada por las enzimas incluyendo la enolasa, la fosfogliceromutasa, la fosfogliceratocinasa, la fosfogliceraldehído deshidrogenasa, la fosfotriosa isomerasa y la aldolasa (96, 188, 192). El equilibrio redox lactato deshidrogenasa suministra el NADH para la oxidación de 1,3-difosfoglicerato (36, 96, 118, 192). En la vida fetal la capacidad gluconeogénica está disminuida. Las adaptaciones metabólicas que ocurren en el neonato--el aumento de glucagon, de la hormona del crecimiento y de cortisol, así como la oxidación incrementada de los ácidos grasos en el hígado (que se refleja como aumento de cuerpos cetónicos circulantes)--contribuyen a elevar la actividad gluconeogénica en los primeros días postnatales (140).

La liberación esplánica de glucosa, en un adulto normal -- que consume 1,800 kcal/día, se aproxima a 180 g/día de los cuales 144 g/día son empleados por el cerebro hasta oxidación completa a CO_2 y H_2O (26, 45, 133). La producción de glucosa por tejido esplánico, durante ayuno toda la noche, da cuenta de 122-420 g/día, cantidad que corresponde a la mitad de la energía calórica basal

(133, 154). Después de 3 días de inanición, la producción esplánica de glucosa es de 80-100 g/día (80% de ésta deriva de gluconeogénesis y el resto presumiblemente procede de glucógeno); 8-10 g se forman a partir de glicerol, 16-32 g provienen de aminoácidos gluconeogénicos, 40-56 g son cuantificables a partir de lactato y piruvato (54, 84, 154, 157). En ayuno prolongado (4-6 semanas) - el glicerol es completamente convertido a glucosa, produce 18 g/día (27, 54, 134). La conversión óptima de sustratos gluconeogénicos en glucosa, es presumiblemente facilitada por los elevados niveles de ácidos grasos libres presentes durante inanición (26, 27, 133). En inanición prolongada la gluconeogénesis renal aumenta, suministra 40 g de glucosa/día, y ocurre una relación estequiométrica entre amoniogénesis y gluconeogénesis. La amoniogénesis es requerida para mantener la homeostasis ácido-base, titulando la pérdida de α -cetoácidos en la orina. El sustrato gluconeogénico primario en riñón es la glutamina (26, 71, 133, 154). La glucosa contenida en el filtrado glomerular es reabsorbida a nivel tubular proximal. La reabsorción tubular máxima es de 225 mg/min esto significa que con una velocidad de filtración glomerular de 120 ml/min, aparecerá glucosuria si la concentración de glucosa en plasma es 180-190 mg/100 ml, niveles encontrados en diabéticos insulina deficientes, en condiciones de ayuno (21, 51, 187). Si la velocidad de filtración glomerular cae debido a enfermedad intrínseca renal o debido a depleción de volumen, concentraciones más elevadas de glucosa en plasma serán requeridas para inducir glucosuria. La glucosa no reabsorbida causa diuresis osmótica la cual progresa en severidad conforme la hiperglicemia se incrementa (21, 51, 187). Durante la diuresis osmótica, la pérdida obligada de -

agua junto con electrolitos es la responsable de la depleción de volumen y de deshidratación, observados en pacientes diabéticos - (21, 51, 187). Disfunciones en los túbulos renales causan glucosuria renal. Anestesia, asfixia y estados emocionales causan glucosuria (92). La orina normal contiene 10-20 mg de glucosa/100 ml (192).

La mucosa intestinal absorbe nutrientes desde lumen y circulación sanguínea. Resultados de experimentos in vivo, ratas en inanición, muestran la cuantificación de metabolitos arteriales - que contribuyen a la respiración del lumen intestinal; la glutamina (aporta el 30% del potencial energético), acetoacetato y β -hidroxibutirato (10-15%) y glucosa (2%). En condiciones normales -- los valores corresponden a 46, 14, y 10%, respectivamente. En en terocitos aislados, los sustratos oxidativos preferentes son la - glucosa, la glutamina y el glutamato (41, 44, 45, 104).

Aproximadamente 10-15% del consumo de oxígeno por tejido - muscular, en condiciones de reposo, cuantifica para la oxidación de carbohidratos. La actividad glucolítica en condiciones basales es muy baja (96, 228). Durante la transición de un estado de reposo al de actividad muscular intensa, aumenta considerablemente la glucólisis (se eleva aproximadamente, 2,000 veces) generando lactato. Se producen 3 molas de ATP por residuo de glucosa metabolizado; ésta deriva de la poza de glucógeno (96, 118, 228, -- 229). La concentración de glucógeno muscular representa 0.5-1.0% del peso húmedo de este tejido, pero debido a la gran masa muscu-

lar esta cantidad es muy grande (96, 118). El ayuno prolongado no depleta la poza muscular de glucógeno. Episodios convulsivos provocan depleción importante de éste. La administración de insulina estimula su síntesis, pero administrada en dosis que provoquen convulsiones hipoglicémicas, induce reducción de los niveles de glucógeno muscular. Durante ejercicio supramáximo intermitente, aumenta en forma sustancial la depleción de glucógeno muscular (soporte energético prominente), se desarrolla hipoglicemia, ocurre un marcado aumento de lactato sanguíneo y disminuyen las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres y β -hidroxibutirato. En la fase inicial de ejercicio, la velocidad de entrada de ácidos grasos libres y β -hidroxibutirato (para su oxidación en músculo) es mayor que la velocidad de su producción (por hígado y tejido adiposo) (72, 122, 149). En la fase avanzada de trabajo muscular, se observa un efecto de "economía de glucógeno" en virtud de que aumenta la oxidación de ácidos grasos libres; la accesibilidad de éstos y de β -hidroxibutirato es superior a la velocidad de su utilización, lo que resulta en incremento de sus niveles en plasma. Se reducen, en forma progresiva y simultánea, la depleción de glucógeno hepático y muscular, y la producción de lactato (72, 122, 149). En la fase inicial de recuperación de trabajo muscular, los niveles de ácidos grasos libres y glicerol persisten elevados; β -hidroxibutirato y glucosa aumentan en sangre (72, 122, 149). El metabolismo energético del músculo cardíaco, en estado de reposo o en actividad moderada, está dado por la oxidación de lípidos (aporta el 70%) y de glucosa (cuantifica con el 30%) (96, 118). La poza de glucógeno, que existe en cantidad -

limitada, soporta la transición desde un estado de reposo al de actividad. En la fase inicial de trabajo, aumenta la contribución de glucosa sanguínea y de glucógeno hasta 82% (96, 118). El corazón metaboliza ácidos grasos libres y lactato circulantes, adaptabilidad que le permite mantenerse al margen de las fluctuaciones de glucosa en sangre. La actividad glucolítica en miocardio solamente genera energía adicional en casos de emergencia (96). El músculo cardíaco, en contraste con los músculos voluntarios, es insensible a los niveles de insulina y la cantidad de glucógeno en este tejido puede variar en dirección opuesta a la de otros músculos (96, 118, 192).

La capacidad del tejido adiposo humano para utilizar los carbohidratos de la dieta, como precursores para la biosíntesis de ácidos grasos, es extremadamente baja en virtud de que el hígado suple esta función en forma importante (105, 153, 221). Las células adiposas expuestas a insulina, experimentan síntesis aumentada de triglicéridos, a partir de glucosa y/o piruvato; la actividad de glicerocinasa es estimulada y ocurren cantidades crecientes de glicerol-3-fosfato. La insulina induce movilización de glucosa por la vía oxidativa de fosfogluconato, potencialmente activa en tejido adiposo, para generar los equivalentes reductores (NADPH) requeridos para la biosíntesis de ácidos grasos (105, 153). En el último trimestre de gestación, los triglicéridos se sintetizan prominentemente a partir de glucosa, en el tejido adiposo fetal (56, 140, 161). La deficiencia absoluta o relativa de insulina y la estimulación por esteroides (liberados por cápsula

suprarrenal) y por hormonas adrenocorticotrópicas, inducen actividad lipolítica en tejido adiposo. Los adipocitos de pacientes -- obesos -células con hiperplasia o hipertrofia debidas a la acumulación excesiva de lípidos- presentan una resistencia relativa a lipólisis. Se ha sugerido que ésta es provocada por la hiperinsulinemia persistente en estos pacientes (133, 221).

La penetración de glucosa al hígado es extremadamente rápida, en contraste con el músculo y el tejido adiposo que requieren de insulina (26, 27, 51). El umbral hepático a glucosa es función del nivel de glicemia y responde a variaciones endócrinas (27, 51, 118). Aproximadamente, 2/3 de la glucosa libre que entra al hepatocito es fosforilada a glucosa-6-fosfato vía hexocinasa. Casi - 1/3 de la glucosa pasa a través del hígado y fluye a sangre sistémica (96). En dieta normal el metabolismo de glucosa-6-P es: la mayor parte de glucosa-6-fosfato se convierte en glucógeno, ácidos grasos o glucosa sanguínea; una porción relativamente pequeña se oxida por completo, vía ciclo de los ácidos tricarbóxicos o bien por la ruta del fosfogluconato (26, 45, 150). En la fase previa a un ayuno breve, el nivel de glicemia es mantenido dentro de límites normales, debido a cambios prominentes en las velocidades de síntesis y ruptura de glucógeno hepático. Estos cambios - están extremadamente controlados, a través de mecanismos homeostáticos y hormonales, por la accesibilidad de glucosa en los tejidos (26, 42, 133, 154). La cantidad de glucógeno hepático depende de la composición de la dieta y del "status" nutricional del individuo (26, 27, 118). El glucógeno hepático puede conformar el

1-10% del peso húmedo de este órgano. En estado postabsortivo -- (12-14 h) el glucógeno constituye la reserva potencial más pequeña en el hombre (75 g equivalente a 300 Kcal) (26, 27, 150, 154). La epinefrina y el glucagon promueven glucogenolisis hepática, -- vía formación de 3'-5' adenilato ciclasa, favoreciendo la conversión de fosforilasa b a fosforilasa a (11, 13, 118). La insulina induce aumento del glucógeno muscular sin afectar al hepático -- (118). Alteraciones en la accesibilidad de glucosa al hígado causan coma hiperglicémico o hipoglicémico (23, 27). El papel del glucagon y de la hormona pituitaria en la evolución de hiperglicemia en pacientes insulina deficientes, ha sido evaluado después de pancreatometomía total e hipofisectomía. Los estudios demuestran que la velocidad de elevación de glucosa es menor en pacientes deficientes de glucagon, cortisol y somatotropina (el efecto decrece en este orden) (23, 27, 133). El hígado es la fuente predominante de síntesis y liberación de glucosa a la circulación, -- en la fase postabsortiva (12-14 horas) y durante ayuno breve (menor de 3 días) (23, 27, 45, 93, 133). El glucógeno hepático se depleta en los primeros 3 días de ayuno, en contraste con el glucógeno muscular (26, 27, 150, 154). En ayuno breve la glucosa deriva del metabolismo gluconeogénico a partir de aminoácidos. En ayuno prolongado (4-6 semanas) más de 3/4 partes del total de glucosa liberada provienen de lactato, piruvato y glicerol. El hígado y riñón contribuyen con el 55% y 45%, respectivamente, a la -- producción total de glucosa por día; sin embargo, la accesibilidad de glucosa útil cae durante inanición prolongada (45, 71, 133, 154). La producción hepática y renal de glucosa en adultos obe--

sos en ayuno de 5-6 semanas es de 86 g/día (19 g derivan de glicero_l, 16 g de aminoácidos gluconeogénicos y 39 g provienen de lactato y piruvato (45, 84, 152, 192). El hígado desempeña una función importante en el reajuste metabólico y energético durante enfermedad generalizada. El periodo febril se acompaña de hipermetabolismo; se acelera la glucólisis y se promueve la gluconeogénesis. La necrosis hepatocelular severa, complicación peligrosa en infección, conduce a hipoglicemia por déficit en la producción de glucosa (11, 12, 32, 141). En hígado hipóxico se acelera la degradación de glucógeno hepático para producir lactato y glucosa, los cuales se liberan a la sangre (163). El mecanismo operativo implica el aumento en la fosforilasa b cinasa o bien la depresión de la actividad de la fosforilasa a fosfatasa (163). Durante la fase tardía de gestación el feto humano almacena glucógeno y grasas (56, 140, 161). Al término de gestación, esta reserva potencial energética representa el 1% y el 16% del peso corporal, respectivamente. El depósito de glucógeno es equivalente a 2 o 3 veces la concentración del glucógeno del adulto (40, 43, 161). Los carbohidratos son la fuente principal de energía del feto; inmediatamente después del nacimiento y antes de iniciar la alimentación, hay una caída de las reservas de glucógeno y de la concentración de glucosa (40-50 mg/100 ml en los primeros 30 min de vida y permanece baja durante un par de horas (40, 79, 140).

El metabolismo cerebral depende, en forma crítica, de la concentración de glucosa en sangre (27, 40, 140, 157). La glucosa atraviesa, a velocidad considerable, la barrera hemato-encefá-

lica (26, 157). El consumo de glucosa por cerebro, en condiciones basales, da cuenta del 70% de la producción hepática neta de glucosa (157). El cerebro exhibe un ritmo metabólico muy elevado; en condiciones basales utiliza el 20-25% del consumo total de oxígeno, a una velocidad de 69 ml/min (96, 118, 157). La velocidad de consumo de oxígeno parece estar regulada por la disponibilidad de compuestos de alta energía que derivan del metabolismo de la glucosa (157). La glucosa es el sustrato potencial que soporta el metabolismo oxidativo energético del cerebro (cociente respiratorio = 1) en estado basal, así como en una variedad de estados fisiológicos y bajo condiciones de "stress" fisiológico (42, 154, -- 157). El cerebro consume, aproximadamente, 6.2 mg de glucosa/100 g de tejido cerebral; el consumo total asciende a 110-145 g/día (54, 154, 157). La utilización de glucosa en sistema nervioso central y cerebro está controlada por la velocidad de su metabolismo más que por la regulación de su transporte (66, 142, 157). La accesibilidad de glucosa al metabolismo oxidativo ocurre más rápidamente en cerebro que en otros tejidos, debido a que la poza intracelular de glucosa en cerebro es muy pequeña (66, 185, 186), además, la capacidad metabólica del cerebro, en contraste con otros tejidos, para emplear otros sustratos como fuente energética está limitada (66, 134, 157). La concentración promedio de glucosa en cerebro es de 8 mg/100 g, comparada con 82 mg en hígado, 51 mg en riñón y 22 mg en músculo (66, 185). El cerebro extrae menos del 5% de la glucosa que llega vía transporte circulación sanguínea (118). La glucosa es utilizada casi exclusivamente por la secuencia glucolítica y por el ciclo de los ácidos tri-

carboxílicos (oxidación completa a CO_2 y H_2O) (96, 118, 157, 184). La velocidad de conversión de glucosa en acetil-CoA, un prerrequisito para la formación de α -oxoácidos, es más rápida en cerebro que en hígado, en riñón o músculo en reposo, debido a que la velocidad de glucólisis en estos tejidos es más baja (66, 157). La carboxilación de piruvato, por piruvato carboxilasa, es un sistema particularmente importante en el cerebro en desarrollo donde su función posiblemente sea de "relleno" de unidades de oxalacetato, de grupos acetil citosólicos y de equivalentes reductores para varias funciones celulares (4, 157). La oxidación de glucosa suministra la energía total que demanda el cerebro, la mayor proporción por oxidación directa y el resto a través de rutas alternativas, como el metabolismo de aminoácidos o bien integrándose a lípidos, en las cuales los intermediarios del metabolismo de glucosa se han incorporado (154, 157, 185). La importancia central -- del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en el metabolismo del tejido nervioso se refleja en las disfunciones neurológicas causadas por alteraciones en el ciclo normal (19, 36, 157). El ATP generado por el metabolismo oxidativo de glucosa soporta la elevada velocidad de renovación de proteínas que tiene lugar en el cerebro, especialmente de las subunidades protéicas de los microtúbulos y de los microfilamentos (157, 185, 186). Aproximadamente -- los tiempos de vida media de 5, 8, 10, y 14 días, se han determinado para las proteínas totales de materia blanca, corteza cerebral, cerebelo y médula espinal, respectivamente (185, 186). Una fracción importante de ATP mantiene el potencial transmembranal -- del cilindro eje, por acción de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa de membrana (96, 157).

La energía que demanda el cerebro, se emplea también para la biosíntesis de acetilcolina y de otras moléculas neurotransmisoras -- (19, 96, 157).

En hipoglicemia se producen anomalías significativas en la función del sistema nervioso central -disfunciones en la actividad intelectual, convulsiones generalizadas- si el nivel de glucosa cae de su nivel normal (80 mg/100 ml) hasta la mitad de esta concentración (24, 192). En coma insulínico (8 mg/100 ml de glucosa sanguínea) el consumo de oxígeno se reduce de 3.4 a 1.9 ml de O_2 /100 g/min). Para este nivel respiratorio reducido, el suministro de ATP es inadecuado para el funcionamiento normal del cerebro (157, 192). En ayuno prolongado el metabolismo oxidativo de la glucosa disminuye, pero el consumo de oxígeno es constante. Por tanto, el mecanismo adaptativo del cerebro a inanición depende de la accesibilidad de otros sustratos energéticos potenciales como los cuerpos cetónicos (54, 134, 154, 166). El niño al nacer presenta cierto grado de asfixia, durante la labor de parto y expulsión. El cerebro del neonato resiste a la ausencia de oxígeno debido a la elevada poza de glucógeno, a su amplia capacidad de glucólisis anaeróbica (hasta lactato) y a la baja velocidad metabólica del sistema nervioso central del neonato respecto a niños de más edad y a adultos (227, 229). Durante asfixia el metabolismo energético es cubierto por la glucólisis hasta lactato, el cual se acumula y ocurre una rápida depleción de glucógeno (227, 229). En el hombre la relación glucosa cerebral (8.0-9.99 mg/100 g de tejido) a extracción de oxígeno por el cerebro (6.02 vol/100 ml)

no ocurre con la estequiometría anticipada (0.75 ml de O_2 /mg de glucosa). Esta desproporción es atribuida a la glucólisis hasta lactato. Así en estado basal, cantidades significativas de piruvato y de lactato se adicionan a la sangre venosa cerebral (157).

3. PIRUVATO Y LACTATO

Piruvato, lactato y alanina son sustratos clave en los -- metabolismos de carbohidratos y aminoácidos (24). Los niveles de estos metabolitos se interrelacionan, vía reacciones enzimáticas de equilibrio, en los fluidos celulares. Participan dos reacciones catalizadas por lactato deshidrogenasa (lactato puede ser un precursor importante de piruvato para gluconeogénesis en el ciclo de Cori) y α -aminoácido 2-oxoglutarato aminotransferasa específica (alanina funciona como el precursor principal de piruvato - en gluconeogénesis (16, 18, 24, 36, 68).

Piruvato y sus derivados, lactato y alanina, aumentan - - excesivamente en los fluidos fisiológicos de pacientes con desordenes hereditarios del metabolismo de piruvato (síndromes dismetabólicos primarios o secundarios del piruvato). En general, pero ciertamente en forma no invariable, la relación de piruvato a lactato tiende a permanecer en los límites normales (16, 18, 24, 36, 78).

Piruvato y acetil-CoA constituyen el enlace primario entre los metabolismos de carbohidratos, lípidos y proteínas (36, 151).

El piruvato ocupa una posición central en el metabolismo intermediario celular. Es un metabolito clave en glucólisis y gluconeogénesis; es la vía principal por la cual la glucosa es oxidada a CO_2 y H_2O ; y está involucrado en lipogénesis (16, 19,

36). Los sistemas enzimáticos de las vías metabólicas fundamentales del piruvato -glucólisis, reducción a lactato, oxidación completa de piruvato (vías descarboxilación oxidativa y ciclo de los ácidos tricarbónicos)- están ampliamente distribuidos en los tejidos incluyendo el corazón, músculo esquelético, cerebro, sistema nervioso central y riñón. El mecanismo anaplerótico, carboxilación de piruvato a oxalacetato, presenta elevada actividad en hígado y en menor extensión en el tejido renal. Las células rojas sanguíneas son predominantemente glucolíticas (27, 36, 154).

El equilibrio homeostático de lactato está determinado por la velocidad y capacidad de producción y por la eficiencia y rapidez de su utilización. Las fuentes de lactato más importantes -- incluyen el cerebro, el músculo esquelético, las células rojas y la médula renal. Los sitios principales de su utilización son el hígado y la corteza renal vía conversión de lactato a glucosa - - (25, 27, 42, 77, 90, 150, 166). El ciclo de Cori (la producción de lactato por unos tejidos y su utilización por otros tejidos diferentes) mantiene la gluconeogénesis y la homeostasis normal - - ácido-base (90, 92, 133, 154). El ciclo de Cori (glucosa-a lactato- a glucosa) no da energía neta ya que el lactato deriva originalmente de glucosa y la energía requerida para la resíntesis de glucosa deriva de la oxidación de grasas. El efecto neto de la - reciclación de lactato (2 molas) es limitar la gluconeogénesis -- desde proteínas deprimiendo la oxidación completa de la glucosa - (hasta CO_2) (26, 28, 42, 133, 154). En inanición prolongada - - (5-6 semanas) casi 1/2 de la glucosa total producida por hígado y

riñón (proveen 85 g de glucosa por día) deriva del lactato y piruvato reciclados. El glicerol (depurado únicamente en hígado) se transforma por completo a glucosa (aporta 18 g/día) (26, 27, 45, 84, 133). El lactato cuantifica con el 46% de la glucosa total liberada por hígado. El lactato contribuye con el 35% de la glucosa total liberada por el tejido esplánico, en condiciones basales provee casi un 21% (54, 84, 89, 92). El etanol inhibe la reciclación del lactato (interconversión glucosa-lactato) y disminuye la entrada de glicerol al hígado (90,92).

Existen sistemas acarreadores electrogénicos, de amplia especificidad, para el transporte de piruvato, lactato, cuerpos cetónicos y dicloroacetato (de interés farmacológico) a través de las membranas mitocondrial y celular. En condiciones fisiológicas, la velocidad de intercambio de piruvato, a través de membrana mitocondrial, es mayor que su entrada neta a mitocondria. Esta ocurre concomitante con la excreción de iones hidroxilo u otro carboxilato intramitocondriales. El mecanismo requiere de un gradiente de protones, a través de la membrana mitocondrial, (la matriz mitocondrial se torna más alcalina que el citosol) soportado por la cadena respiratoria. La excreción de lactato es importante en células con elevada velocidad de glucólisis. La asimilación de lactato por las células hepáticas es esencial para gluconeogénesis (36, 139, 215, 235).

Estudios en corteza cerebral de cobayos demuestran que lactato o piruvato, en concentración 5 mM, pueden soportar la

misma velocidad de consumo de oxígeno que la glucosa. Los resultados sugieren la posibilidad de que los dos sustratos sean una fuente energética alternativa del sistema nervioso central cuando la accesibilidad y difusión de glucosa están deprimidas, a pesar de que la velocidad de penetración de lactato en cerebro está limitada. La concentración de piruvato en sangre es muy baja ($100 \mu\text{M}$) lo cual implica que estas observaciones pudieran carecer de significado fisiológico en condiciones metabólicas normales. Los niveles de lactato pueden elevarse en forma importante por arriba del nivel normal (1 mM) por ejemplo en condiciones de ejercicio severo (77, 120, 150).

Condiciones de inanición, diabetes aguda o trabajo muscular intenso se asocian a movilización y oxidación incrementada de ácidos grasos. Experimentos recientes indican que los ácidos grasos desempeñan una función importante en la regulación de los metabolismos de piruvato y ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos (succinato, fumarato, malato, oxalacetato). La oxidación acelerada de los ácidos grasos estimula la carboxilación de piruvato vía aumento de la poza de acetil-CoA, efector alostérico de la enzima piruvato carboxilasa. El proceso oxidativo de los ácidos grasos suministra los equivalentes reductores para la conversión de oxalacetato a malato y provee la energía que soporta la vía gluconeogénica. El malato transporta el poder reductor desde mitocondria a citosol y es el precursor de fosfoenolpiruvato (36, 188).

La glucosa es el precursor primario de piruvato por la vía glucolítica. La enzima piruvato cinasa (exclusivamente citoplasmática) cataliza el paso final de la glucólisis, la transferencia del grupo fosfato desde fosfoenolpiruvato al adenosín-difosfato (ADP), produciendo piruvato libre. La reacción es irreversible en condiciones intracelulares. La actividad de la enzima es inhibida cuando el cociente ATP/ADP se eleva relativamente o cuando pueden utilizarse otros sustratos -ácidos grasos, citrato, acetil-CoA o alanina- para producir energía (36, 96, 118).

El piruvato se reduce a lactato a expensas del poder reductor cedido por 3-fosfogliceraldehído y transportado por NADH-reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) -citoplasmática (18, 36, 96, 118). El cociente lactato: piruvato (L/P) refleja el estado actual oxidorreductor del compartimiento citoplasmático, indicando que el lactato está en rápido equilibrio con el sistema NADH/NAD^+ (16, 18, 36, 118, 215). El aumento en la generación de NADH glucolítico, en el paso de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, causa un rápido aumento en el flujo a través de malato deshidrogenasa citosólica (MDH) en orden a proveer NAD^+ por reoxidación. El incremento del par redox NADH/NAD^+ en citoplasma se correlaciona con el aumento de β -hidroxibutirato mitocondrial (16, 36, 118, 182). En inanición breve la alanina estimula el flujo de equivalentes reductores desde mitocondria a citoplasma, vía lanzadera malato-aspartato dejando a la mitocondria en un estado más oxidado. La formación

de acetoacetato en este compartimiento se ve favorecida (36, 138, 152). En inanición prolongada y en diabetes, los pares redox -- NADH/NAD^+ citoplasmático y mitocondrial se elevan. Resulta como efecto secundario de estos cambios una depleción del cociente -- ATP/ADP a través de los equilibrios de reacción gliceraldehído -- deshidrogenasa y 3-fosfogliceratocinasa (36, 138, 152, 155).

Aparentemente existe una correlación entre los pares redox (mitocondrial y citoplasmático), el estado de fosforilación de adenina dinucleótidos y la producción de glucosa (36, 138, 152). En condiciones de anoxia y en contracción muscular rápida, la velocidad de glucólisis se eleva, aumenta el potencial redox citosólico y el equilibrio LDH se desplaza hacia la formación de lactato (36, 138, 155). En general, la glucólisis hasta lactato es modulada por condiciones que interfieren con el mecanismo oxidativo mitocondrial, específicamente con la producción de ATP, vía fosforilación oxidativa. Esta relación es la base del efecto Pasteur -- (16, 36, 157, 215). La glucólisis hasta lactato compite con la respiración por el P_i (específicamente a nivel de las vías glucógeno fosforilasa, 3-fosfogliceril-fosfato y en el sitio piruvato -- cinasa) y por la accesibilidad de ADP (en el sitio oxidación de lactato a piruvato vía ciclo de los ácidos tricarbónicos) (36, 138, 152, 157). Un aumento en la disponibilidad de oxígeno estimula la oxidación de lactato y piruvato hasta CO_2 y H_2O (vía ciclo de los ácidos tricarbónicos). La acelerada producción de ATP y citrato (por estimulación anaplerótica) inhiben la actividad de la fosfofructocinasa (PFK) y por ende la función glucolítica hasta lactato. Una fracción importante de la energía generada --

se emplea para la resíntesis de glucosa y glucógeno a partir del lactato en exceso. La reutilización de lactato previene que éste se acumule en los tejidos glucolíticos y reduce el consumo neto de glucosa como sustrato energético (16, 36, 118, 157). En condiciones de hipoxia o shock aumenta rápidamente la producción de lactato (16, 36, 163).

Los aminoácidos alanina, glicina, serina y cisteína son catabolizados hasta piruvato el cual se emplea como sustrato gluconeogénico o entra en la vía ciclo de los ácidos tricarbónicos como acetyl-CoA. La treonina produce dos moléculas de acetyl-CoA, una por la vía del piruvato y otra directamente (41, 44, 96, 180). La alanina transamina con el α -cetoglutarato (vía α -aminoácido 2-oxoglutarato aminotransferasa específica) produciendo piruvato (52, 82, 96). Este equilibrio es importante donde grupos amino (que derivan de la oxidación de valina, leucina e isoleucina) se transfieren fuera del músculo (fundamentalmente como alanina) para gluconeogénesis o ureogénesis, ambas en hígado (52, 82, 96). La alanina representa, por excelencia, el transporte de unidades de 3 carbonos desde músculo esquelético hasta el hígado (18, 36, 118).

La oxidación de piruvato a CO_2 y acetyl-CoA con la producción concomitante de NADH es catalizada por el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDHC), exclusivamente intramitochondrial (16, 18, 19, 36). Esta vía constituye un paso obligatorio (de regulación) para la incorporación del carbono que deriva

de los carbohidratos al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (4, - 36, 43, 68). El complejo enzimático utiliza 5 cofactores - tiami na pirofosfato (TPP), ácido lipoico (ácido ditio-octanoico), coen zima A, flavina adenina dinucleótido (FAD), NAD^+ - y requiere de Mg^{2+} (16, 18, 36, 68, 139). Las 3 enzimas del complejo actúan -- coordinadamente. La piruvato deshidrogenasa (PDH, E_1) descarboxi la oxidativamente al piruvato, se forma CO_2 y el fragmento resi- dual de 2 carbonos se une a TPP formando hidroxietiltiamina. La - dihidrolipoil transacetilasa (DLT, E_2) cataliza la transferencia y la oxidación simultánea del fragmento de 2 carbonos en la - - hidroxietiltiamina a CoA formando acetil-CoA. En este paso el - anillo disulfuro del ácido lipoico (enlazado covalentemente a la enzima) se reduce a la forma dihidro y en forma simultánea se - oxida un equivalente de acetaldehído a un equivalente de ácido -- acético. La dihidrolipoil deshidrogenasa (LAD, E_3) reoxida el - ácido lipoico transfiriendo los hidrógenos desde el ácido dihidro lipoico al FAD (enlazado a la enzima) y desde FADH_2 a NAD^+ solu- ble (16, 17, 18, 19, 43, 68, 139, 148). La regulación del comple jo PDHC depende fundamentalmente de la inhibición por producto -- causada por NADH (competitivamente con NAD^+) y por acetil-CoA - (competitivamente con CoA) (16, 18, 19, 36, 139). El complejo es inactivado por una proteína-cinasa específica (PDH_a cinasa) que -- incorpora el γ -fosfato de ATP en tres serinas específicas (o fos- forila cualquiera de estos sitios) de la subunidad α de la E_1 . La fosfoproteína fosfatasa específica (PDH_b fosfatasa) reactiva a la enzima (18, 68, 139, 148). Numerosos factores alteran el - - equilibrio cinasa-fosfatasa pero el más importante parece ser el

cociente mitocondrial ATP/ADP. La PDH_a cinasa es activada por -- los cocientes aumentados incluyendo NADH/NAD⁺, CoASH/CoA y ATP/ - ADP. Es inactivada por piruvato, CoA, TPP, ADP, Mg²⁺ y concen-- traciones elevadas de K⁺ (16, 36, 68, 139, 148). La PDH_b fosfata sa es activada por Ca²⁺ y Mg²⁺ (16, 18, 36, 139).

En dieta rica en carbohidratos aumenta la actividad de -- PDHC y en consecuencia se eleva la poza de acetil-CoA. Una frac-- ción importante del acetil-CoA se emplea para la biosíntesis de - ácidos grasos y esteroides en los tejidos incluyendo el hígado, - el tejido adiposo y la glándula mamaria (cuando es requerido). El acetil-CoA es un sustrato bioenergético primordial (vía ciclo de los ácidos tricarbóxicos) en cerebro y músculo (16, 18, 19). El cerebro depende críticamente de la oxidación continua de piru vato. Alteraciones de la oxidación de piruvato se manifiestan - en disfunciones de la actividad cerebral (16, 19, 157, 166). En inanición disminuye la actividad de PDHC, este mecanismo promue- ve la conservación de glucosa y de glucógeno (18, 37).

Condiciones que estimulan el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos (inanición, diabetes) inhiben la PDHC. Operan dos mecanismos principales: a) el efecto inhibitorio que ejercen el NADH, el acetil-CoA y las cadenas largas acil-CoA de ácidos gra- sos, sobre la forma activa del complejo enzimático; y b) el au- mento de los efectores primarios de inactivación NADH/NAD⁺, ace- til-CoA/CoASH y ATP/ADP- que afectan específicamente el equili- brio cinasa-fosfatasa (43, 68, 139, 188, 215). Una oxidación - acelerada de los ácidos grasos previene el metabolismo oxidativo

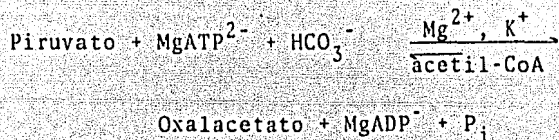
del piruvato y permite que éste sea dirigido a otras vías (gluconeogénesis) (24, 43, 139, 188). Se ha demostrado, en un sistema cetogénico, que existe una correlación directa entre la velocidad de cetogénesis y la extensión de la estimulación del complejo - - PDHC, opera activamente el traslocador monocarboxilado de membrana mitocondrial. El sistema experimental fue expuesto a una concentración limitada de piruvato (posiblemente niveles fisiológicos); la funcionalidad del equilibrio PDH_a cinasa- PDH_b fosfatasa fue mantenida; la producción de acetoacetato fue provista por precursores cetogénicos (ácidos grasos de cadenas largas o medias, β -HB, α -cetoisocaproato y acetato). Opera un acelerado intercambio iónico, vía traslocador monocarboxilado, a través de la -- membrana mitocondrial (piruvato_(cit)/acetoacetato_(mit) y/o piruvato_(cit)/acetoacetato + β -hidroxibutirato_(mit)) generando un flujo neto aumentado del transporte de piruvato a la mitocondria y estimulando la actividad del complejo PDHC hepático (36, 139, 215).

La carboxilación de piruvato para formar oxalacetato es - catalizada por la piruvato carboxilasa (PC) exclusivamente mitocondrial (4, 16, 78, 158, 193). Constituye una vía clave en la - regulación del flujo de carbono a diversas rutas metabólicas. - a) Es el paso limitante de la velocidad de gluconeogénesis (desde piruvato) y representa la primera reacción en esta vía. Presenta elevada actividad en hígado y en corteza renal, es relevante - en el metabolismo del cerebro y sistema nervioso central en desarrollo (4, 5, 68, 70, 90, 206). b) Está involucrada en lipogénesis fundamentalmente del tejido adiposo café y blanco, en hígado

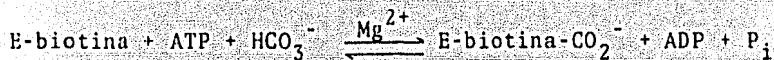
y en tejido mamario (en situaciones metabólicas específicas). - La actividad de la enzima presenta pocos cambios en concentración durante inanición y realimentación, situación que refleja su importancia en las vías lipogénica y gluconeogénica (4, 16, 43, 78, 101). c) Provee mecanismos regulatorios para la función cetogénica hepática (16, 19, 78). - d) Suministra un mecanismo anaplerótico y de "relleno" de intermediarios (de 4 carbonos) al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Esto implica que está involucrada en la operación adecuada del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (5, 19, 78, 218, 235). e) Provee el esqueleto carbonado para la síntesis de aminoácidos neurotransmisores --glutamato, aspartato-- y de γ -aminobutirato (GABA) (16, 18, 19, 159). f) Subsecuentes investigaciones involucran a esta vía en la biosíntesis de --esteroides, de glicerol (a partir de lactato) y en el crecimiento de algunos micro-organismos que emplean al piruvato o lactato como única fuente de carbono (19, 159).

La síntesis de oxalacetato ocurre a velocidad significativa en presencia de piruvato, ATP, Mg^{2+} y HCO_3^- . El acetyl-CoA es el activador alostérico crítico de regulación de la PC (78, --158, 206, 218). El K^+ es el activador específico más efectivo de la enzima PC hepática. El Na^+ es inefectivo o posiblemente sea un inhibidor débil (19, 78, 158, 181). La enzima es tetramérica, presenta 4 subunidades polipeptídicas idénticas con respecto a tamaño y a contenido de biotina. Una molécula de biotina (cofactor de la PC) se enlaza, en forma covalente, por cadena polipeptídica. La avidina al unirse a la biotina impide la activa

ción de la enzima (158, 206, 218, 235).



Hay amplia evidencia de que todas las reacciones catalizadas por una enzima dependiente de biotina proceden vía dos reacciones parciales (36, 78, 95, 206):

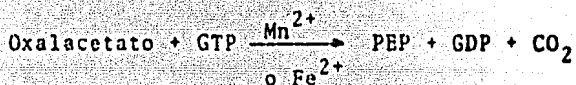


La enzima PC puede estar regulada por el cociente ATP/ADP. ADP actúa como un inhibidor competitivo (78, 158, 206). Niveles milimolares de fenilpiruvato y p-hidroxi-fenilpiruvato (elevados en fenilcetonuria y tirosinemia hereditaria, respectivamente) - - inhiben de forma significativa la actividad de la PC (36, 78, 158, 169). La enzima PC presenta elevada actividad en el cerebro, -- suministra el mecanismo de "relleno" de oxalacetato y de grupos acetilo citosólicos así como los equivalentes reductores para varias funciones de las neuronas (4, 16, 17, 206). En riñón, la -- enzima PC es de particular importancia en la reabsorción de HCO_3^- . Una deficiencia en ésta ocasiona acidosis tubular renal proximal (inhabilidad de excretar H^+) (4, 25). También se le atribuye un

papel gluconeogénico (4, 25, 150). En tejido muscular esquelético la enzima presenta baja actividad; sin embargo, constituye una de las vías anapleróticas, de relevancia fisiológica, responsable de la acumulación neta de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en este tejido bajo diferentes condiciones metabólicas-ej. en inanición, en diabetes, en trabajo muscular- (34, 206). Se ha postulado que la PC muscular contribuye a la síntesis de glucógeno (a partir de lactato); sin embargo, su actividad no es significativa comparada con la cantidad de glucógeno acumulada en este tejido (34). La enzima ocurre en elevados niveles en el tejido adiposo siendo de interés en lipogénesis (4, 18, 24, 101).

El flujo de carbono a la vía gluconeogénica parece estar catalizado, en forma predominante, por la PC. La enzima málica (NADP^+ -enlazada) y la carboxilación de α -cetoglutarato por la isocitrato deshidrogenasa contribuyen poco (5, 68, 188). Los principales productos de la carboxilación de piruvato son: el malato, el fumarato, el citrato y el aspartato (en presencia de glutamato) (188). El oxalacetato sólo se acumula en pequeñas cantidades debido al estado redox altamente reducido de la mitocondria que desplaza el equilibrio malato deshidrogenasa (MDH) hacia malato (36, 188). La concentración mitocondrial de oxalacetato es más de un orden de magnitud más pequeña que la concentración citoplasmática de éste (36, 78). La velocidad de formación de oxalacetato varía dependiendo del "status" fisiológico y nutricional del individuo (158, 159). Así, el camino gluconeog

génico desde piruvato procede en forma de malato, fumarato y aspartato (intramitocondriales) los cuales difunden a citosol para ser convertidos a fosfoenolpiruvato (PEP) vía oxalacetato (36, 188). La enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) dependiente de GTP, descarboxila y fosforila al oxalacetato formando fosfoenolpiruvato (PEP). Esta vía revierte la glucólisis en gluconeogénesis y glicerogénesis. La PEPCK requiere de una proteína ferroactivadora (Fe^{2+}). Está presente en citosol y mitocondria. Su actividad está determinada por la accesibilidad de oxalacetato. Su actividad disminuye en endotoxemia severa causando depresión de la gluconeogénesis (5, 78, 138, 140, 193).



El principal mecanismo de utilización de piruvato en lipogénesis es la difusión de acetyl-CoA (que deriva de la oxidación de piruvato, vía PDHC) a citosol, el cual es liberado como citrato (18, 36, 101). En citosol la citrato liasa (CL) rompe el citrato en acetyl-CoA y oxalacetato. El acetyl-CoA se dirige a lipogénesis vía acetyl-CoA carboxilasa, enzima que debido a sus propiedades alostéricas es la limitante de la velocidad de biosíntesis de ácidos grasos (101, 206, 217). El oxalacetato entra a la mitocondria vía NAD^+ -malato deshidrogenasa (reducción de oxalacetato a malato) y NADP^+ -enzima málica (descarboxilación de malato) produciendo piruvato. La carboxilación de piruvato vía PC repleta la poza intramitocondrial de oxalacetato (36, 101). La insulina y las catecolaminas estimulan lipogénesis en el

tejido adiposo e inducen cambios paralelos en la concentración de PK, PDHC y acetil-CoA carboxilasa (101, 110, 111).

Las alteraciones en la oxidación de glucosa o piruvato en el tejido cerebral parecen reducir la función biosintética (vías que utilizan energía) más que las vías generadoras de energía, si bien los carbohidratos son la fuente energética crítica del sistema nervioso central (16, 18, 19, 78). En los desordenes del metabolismo del piruvato, los trastornos neurológicos son causados por la producción deficiente de neurotransmisores más que por la síntesis inadecuada de ATP y compuestos de alta energía relacionados (16, 18, 19, 78). En la deficiencia en PDHC la síntesis de acetilcolina está deprimida, si bien menos del 1% del piruvato oxidado se incorpora en el grupo acetilo de la acetilcolina. Eventualmente, la producción de ATP está inhibida (oxidación deprimida a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos y cadena de transporte electrónico)(16, 18, 19). Los agonistas colinérgicos, fisostigmina, colina y lecitina, probados inicialmente en ataxias hereditarias, parecen ser de valor terapéutico en este desorden (16, 18, 19). En el cerebro en desarrollo, el acetil-CoA puede derivar de la oxidación de cuerpos cetónicos (18, 19, 43). La terapia con una dieta cetogénica (rica en grasas, aproximadamente el 50% del aporte energético total provisto por grasas) para hacer al paciente cetonémico y cetonúrico pero no acidótico o hipoglicémico, contribuye a hacer más lenta la evolución de los trastornos neurológicos pero no los detienen (16, 19, 30, 43).

En la deficiencia de PC el daño en la producción de oxalacetato causa depresión de los mecanismos incluyendo la gluconeogénesis, operación adecuada del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la síntesis de aminoácidos neurotransmisores -ej. glutamato, aspartato y γ -aminobutirato (GABA) (16, 19, 24, 78, 95). Se ha sugerido que la hiperpiruvicemia e hiperlactatemia en este desorden, inducen severa degeneración del tejido cerebral. Se postula que el piruvato interfiere con el metabolismo del glutamato, notoriamente en las reacciones de aminotransferasas; además, el lactato en concentración 5 mM inhibe la entrada de glucosa en la corteza cerebral (18, 77, 120, 150). La terapia de dietas suplementadas con ácido aspártico o ácido glutámico elevará la poza de ácidos dicarbóxicos de 4 carbonos, severamente limitada por la accesibilidad disminuída del oxalacetato, y promoverá la vía gluconeogénica (19, 78, 182). Se tienen reservas de que esta terapia corrija las anormalidades neurológicas ya que estos sustratos presentan permeabilidad restringida en el cerebro. Ambos sustratos deben experimentar amidación en tejidos no neurales - (ej. a asparagina y glutamina) cruzando de esta forma fácilmente la barrera hematoencefálica (19, 78, 184, 192).

La entrada esplánica neta de lactato representa, aproximadamente, el 30-35% de la velocidad de producción total de lactato (0.91 mmol/kg/h o 1400 meq/día) corregida para una concentración promedio de lactato sanguíneo de 0.7 meq/l (90, 91, 182, 223). La capacidad hepática para depurar lactato (contribuye, aproximadamente, con el 30% de la depuración total) está limitada. Se

reduce si el flujo sanguíneo hepático disminuye ($\leq 25\%$ del flujo sanguíneo normal) y el hígado inicia la producción de lactato contribuyendo a la acidosis láctica (90, 91, 223). En pacientes con cirrosis hepática estable en ayuno mayor de 3 días, la velocidad de extracción hepática de lactato disminuye debido a la colateralización o desviación del flujo sanguíneo más que a la enfermedad del parénquima ya que la actividad de las enzimas gluconeogénicas es normal. El alcohólico alimentado presenta acidosis láctica. El alcohólico en inanición exhibe cetoacidosis después de la ingestión reciente de alcohol. No es común que el alcohólico presente acidosis láctica y cetoacidosis a la vez - - (90, 91, 230). En diabetes insulina-dependiente, la producción basal de lactato y después de ejercicio submáximo muscular amenta (180-500% de lo normal); el lactato no se acumula debido a -- que aumenta la extracción esplánica (90, 223, 230). La intoxicación con salicilatos y biguanidas produce acidosis metabólica combinada (láctica y cetoacidosis) (91, 223).

En estado basal el músculo oxida fundamentalmente ácidos grasos, β -oxidación que se enlaza de forma directa a la operación del ciclo de Krebs. El tejido músculo-esquelético no lleva a cabo gluconeogénesis significativa y síntesis de novo de ácidos grasos, procesos que requieren una repleción continua de la poza endógena de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Sin embargo, los sistemas enzimáticos que mantienen un nivel constante de intermediarios del ciclo--flujo anaplerótico (a través de reacciones de carboxilación) y eliminación compensa

toria (por reacciones de descarboxilación)-- están presentes. Las enzimas fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK), enzimas málicas NADP^+ y NAD^+ específicas y piruvato carboxilasa (PC) se encuentran en cantidades variables (95, 138). La poza común de piruvato en músculo esquelético deriva del glucógeno o glucosa (vía glucólisis) y en estado catabólico del metabolismo de los aminoácidos libres endógenos del músculo (vía ciclo de los ácidos tricarbónicos y enzimas málicas NADP^+ - dependientes) (52, 95, 138). La utilización de los aminoácidos endógenos regula los niveles de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, provee la síntesis neta de precursores de glucosa (alanina, lactato), libera nitrógeno desde músculo, y soporta la oxidación completa de otros sustratos (cuando es requerido) incorporándolos como intermediarios del ciclo de Krebs. El piruvato puede experimentar oxidación completa, puede transaminarse (formación neta de alanina) o bien puede reducirse a lactato (52, 82, 95, 138). Durante ejercicio extenuante (10 segundos después) o siguiendo a un proceso convulsivo de "gran mal" (1-2 min después) ocurre una sobreproducción periférica de lactato (12 y 20 meq/l, respectivamente) adicional a la producción basal (1 meq/l) (90, 131, 223), la cual produce acidosis láctica (90, 131, 223). Se ha experimentado que durante ejercicio prolongado conducido con 50% de entrada máxima de oxígeno, por 3-3 1/2 horas, aumenta la concentración arterial de lactato (1.5 meq/l), aumenta la extracción esplánica (de 0.27 mmol/min a 0.68 mmol/min). A los 40 min. de recuperación la extracción esplánica alcanza 0.85 mmol/min (casi 50 mmol/h) en el tiempo en que el lactato en plasma --

disminuye desde 1.5 a 0.9 meq/l (90, 131, 132). En músculo cardíaco casi 1/2 del piruvato se metaboliza vía PDHC, en estado basal (96). En actividad muscular casi el 80% del piruvato se reduce a lactato (96).

El riñón emplea para su metabolismo los ácidos grasos libres, el lactato y piruvato, la glucosa, los cuerpos cetónicos y los aminoácidos (96, 118). En riñón ocurre una cooperación metabólica intra-renal: la glucosa que se sintetiza en la corteza renal es transportada a la médula renal donde forma lactato vía glucolisis. Algo del lactato que libera la médula renal retorna a la corteza para regenerar glucosa. La enzima PC puede ser crítica en este sistema contra-regulatorio (25, 78, 150).

La acidosis láctica es causada por una acumulación en los niveles de lactato, se asocia con una reducción recíproca de la reserva de HCO_3^- . Se caracteriza por un aumento en la brecha de aniones ($[\text{Na}^+] - [\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-]$); con un valor normal promedio de 12 meq/l y límites de 5-15 meq/l). Una concentración de lactato ≥ 5 meq/l y un pH sistémico ≤ 7.25 identifican a una acidosis láctica significativa. Esta definición no excluye la posibilidad de que un menor grado de acumulación de lactato y acidemia puedan representar acidosis láctica (90, 223, 230). La acidosis láctica refleja la ocurrencia de disfunciones mitocondriales que reducen el almacenamiento de ATP y NAD^+ y originan la acumulación de NADH y de ión hidrógeno metabólico (H^+). Las vías bioquímicas que se alteran en acidosis láctica son 5 fundamentalmente. Dos

reacciones son ATP-dependientes catalizadas por la fosfofructo-
 cinasa (PFK) citosólica (cataliza la conversión de fructosa 6-fos-
 fato a fructosa 1,6-difosfato) y la piruvato carboxilasa (PC) mito-
 condrial (paso limitante gluconeogénico). Dos reacciones son --
 NAD⁺-dependientes, catalizadas por el complejo PDHC (conversión -
 de piruvato a acetil-CoA) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidro-
 genasa (conversión de gliceraldehído 3-fosfato a ácido 3-fosfogli-
 cérico). Y el equilibrio lactato deshidrogenasa (LDH), reoxida-
 ción citosólica de NADH que soporta el mecanismo glucolítico con-
 tinuo cuando la función mitocondrial está dañada (90, 91, 223, - -
 230). La producción de lactato celular es concomitante a la ge-
 neración de iones hidrógeno (derivados de la hidrólisis de ATP) -
 y se asocia a una reducción recíproca de la poza de HCO₃⁻. La -
 oxidación o la conversión de lactato a glucosa consume iones hi-
 drógeno (H⁺) y/o genera bicarbonato (HCO₃⁻). La acidosis metabó-
 lica resulta cuando aumenta la hidrólisis de ATP o la reducción -
 de NAD⁺ (NADP⁺) o cuando la resíntesis de ATP y la reoxidación de
 NADH (NADPH) es dañada, es decir disminuye la reutilización de --
 iones hidrógeno. La homeostasis ácido-base requiere que la pro-
 ducción de iones hidrógeno y la pérdida de HCO₃⁻ sea contrarresta-
 da por la utilización de lactato y por la regeneración de HCO₃⁻
 ya que los mecanismos renales no son capaces de mantener la poza
 de HCO₃⁻ cuando la velocidad diaria de producción de lactato es -
 considerada (0.91 mmol/Kg/h o 1400 meq/día) (90, 91, 223, 230).
 El mantenimiento de la homeostasis normal ácido-base requiere que
 el lactato sea reutilizado rápidamente y eficientemente. La aci-
 dosis láctica ocurre cuando aumenta la producción periférica de -

lactato, disminuye su utilización o bien ocurren ambos mecanismos (88, 90, 91, 223).

Las deficiencias enzimáticas que se asocian a acidosis láctica congénita se han demostrado en dos áreas principales: a) en las enzimas del complejo PDHC - se han descrito deficiencias específicamente en las enzimas E_1 , en la E_2 y en la E_3 , así como en la PDH_b fosfatasa (16, 30, 148); y b) en las enzimas clave de la vía gluconeogénica -la glucosa-6-fosfatasa, en la fructosa 1,6-difosfatasa, la piruvato carboxilasa (PC) y en la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK)- las cuales se asocian invariablemente a hipoglicemia severa en ayuno (4, 5, 16, 67, 148).

La acidosis metabólica caracterizada por hiperlactatemia, hiperpiruvicemia e hiperalaninemia se asocia con un bloqueo en el metabolismo del piruvato (4, 5, 68, 120, 208). La acidosis láctica tipo episódico o crónico presenta una variedad de síntomas: retraso en el desarrollo, episodios atáxicos, hipoglicemia, atrofia óptica, convulsiones, hipertonia, hepatomegalia y retraso en el desarrollo neurológico (18, 30, 148, 155, 182). Los bloqueos enzimáticos en la operación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y del sistema de citocromos también producen acidosis láctica. Se ha descrito en examen postmortem la deficiencia en citocromo a_3 y/o en citocromo b , defecto confinado en el músculo esquelético (148). Las miopatías mitocondriales (producción aumentada de lactato por músculo) y la glucogenosis hepática también desarrollan acidosis láctica (182).

La encefalomielopatía necrozante subaguda de Leigh, error metabólico que se asocia con más de una anormalidad bioquímica- alteración en el metabolismo de tiamina trifosfato, o las deficiencias de PDHC y PC- se desarrolla con acidosis láctica (16, 61, 68, 77, 158). La terapia con dosis farmacológicas de cofactores y vitaminas se ha aplicado para controlar la acidosis láctica; la tiamina (propildisulfuro o tetrafurfurildisulfuro) aumenta la saturación de PDHC o inhibe la PDH_a cinasa, estimulando la oxidación del piruvato.

La deficiencia múltiple de carboxilasas- propionil CoA carboxilasa, β -metilcrotonil-CoA carboxilasa y piruvato carboxilasa- responde a dosis elevadas de biotina (10 mg/d). La holocarboxilasa sintetasa une covalentemente biotina a las varias apocarboxilasas inactivas para formar la holocarboxilasa activa (holoenzima activa). La alteración metabólica puede ser causada por un defecto primario en la holocarboxilasa sintetasa común a las enzimas de este desorden (59, 60, 75, 151, 174, 204). La terapia farmacológica de dicloroacetato reduce lactato y piruvato inhibiendo la PDH_a cinasa, pero su utilidad clínica se cuestiona debido a -- que es un compuesto neurotóxico (18, 19). Se ha empleado el tris-hidroxiaminometano (THAM) para tratar condiciones en las que la oxidación de piruvato está dañada (18). El envenenamiento con toxinas que dañan el metabolismo oxidativo -cianuro, monóxido de carbono, plomo, mercurio, hipoglicémicos orales, biguanida- pueden producir acidosis láctica profunda. En ingestión de alcohol, metanol y etilenglicol, la acidosis láctica y otros ácidos tóxi-

cos (fórmico, glicólico y acético) contribuyen a la acidosis metabólica (16). En infecciones severas acompañadas por shock -- séptico aumenta la producción de lactato y compuestos ácidos (11, 12, 141).

4. ALANINA

Alanina, glutamato, aspartato y glutamina son los aminoácidos más abundantes de la célula (104, 180, 226). Cada uno de ellos (alanina, glutamato y aspartato) procede por transaminación de un α -cetoácido (piruvato, α -cetoglutarato y oxalacetato) respectivo catalizada por la aminotrasferasa específica (96, 118, 192). Piruvato, lactato y alanina desempeñan un papel central en el metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos (24, 44, 45, 47, 57). En condiciones normales, existe una relación directa entre los niveles plasmáticos de alanina y piruvato; ésta no se observa entre piruvato y otros aminoácidos (24, 44, 46, 104). En ejercicio, la concentración arterial de alanina se eleva (25-100 por ciento) conforme a la intensidad del trabajo muscular y conserva la relación directamente proporcional con la concentración arterial de piruvato (41, 44, 192).

Existe una interrelación entre los niveles de los aminoácidos y el metabolismo de los principales sustratos potenciales energéticos (ácidos grasos, cuerpos cetónicos y glucosa) (70, 146). El nivel de glucosa en plasma puede modificar la síntesis de alanina de novo. Condiciones hiperglicémicas (de consecuencias fisiológicas moderadas e independiente de los niveles aumentados de insulina) inducen un aumento de la velocidad de liberación de alanina a la circulación (70, 104, 146). El sitio fundamental de biosíntesis de alanina es el músculo esquelético. El aumento en la producción de alanina ocurre concomitante con un balance neto

negativo de nitrógeno en músculo (47, 52, 70, 146).

En diabetes mellitus (cetósica y no cetósica) se incrementa la concentración arterial de los aminoácidos de cadena ramificada y la alanina cae. La extracción fraccional esplánica de alanina, lactato y piruvato aumenta en un 50% a 100%. Los sustratos gluconeogénicos dan cuenta del 40% al 45% de la producción hepática de glucosa (45, 71, 84, 187). En contraste, en el estado post abortivo y condiciones normales la contribución de los precursores glucogénicos da cuenta del 15-20% (44, 45, 46). En otros estados fisiológicos (ayuno por 72 horas, ejercicio continuo por -- más de 40 min, obesidad) ocurre una adaptación metabólica similar a la descrita arriba (44, 46, 64). En individuos obesos el marcado intercambio esplánico de aminoácidos refleja la resistencia relativa de las células musculares y adipocitos a la acción de la insulina. Se ha sugerido que la ocurrencia de la hiperaminoacidemia es la responsable de la hiperinsulinemia que se observa en -- obesidad. La hiperinsulinemia se asocia a su vez con una marcada depleción de la cetogénesis (44, 45, 46, 64). En trabajo muscular aumenta la liberación de alanina desde músculo en un 50-500% conforme a la intensidad del ejercicio (41, 44, 187).

En inanición prolongada, diabetes aguda y en trabajo muscular extenuante, el metabolismo gluconeogénico es soportado por la oxidación acelerada de los ácidos grasos libres (44, 47, 104, 188). La extracción fraccional esplánica de alanina disminuye en forma marcada. El glicerol (producto lipolítico), la alanina, el lacta

to y piruvato se incorporan en glucosa o glucógeno (41, 44, 84, - 188). En diabetes no controlada o en condiciones de secreción excesiva de cortisol o tirosina, el balance negativo de nitrógeno - en músculo (predomina la liberación de alanina) evoluciona más rá- pidamente que en inanición (48 horas) en estado normal (45, 52, - 82). En inanición prolongada ocurre hipoaminoacidemia generaliza- da en la cual la caída de alanina es más prominente. En contras- te, se observa que en desnutrición proteínica-calórica y Kwashiorkor o bien en adultos normales con dietas hipoprotéicas, ocurre - un aumento marcado de alanina en plasma (44, 45, 84, 104). La excreción de alanina por músculo se reduce en forma drástica y la - extracción fraccional esplánica disminuye en un 90% (44, 45, 47, 133). La ingesta intermitente de carbohidratos provoca acumula- ción de alanina en plasma, ya que limita su entrada a hígado (44).

En condiciones normales y en algunos casos patológicos -- (piruvicemia infantil o hipoglicemia inducida por inanición) se - ha reportado una correlación existente entre las concentraciones de cuerpos cetónicos y alanina en sangre. Existe una relación ce- rrada entre la concentración de cuerpos cetónicos y la velocidad de producción de alanina (1, 57, 127, 128): La infusión I.V. de alanina a pacientes somatostatina-deprimidos produce un decremen- to de los cuerpos cetónicos en sangre sin afectar el cociente - - β -hidroxibutirato: acetoacetato (β -HB/AcAc) (1, 48, 57, 109). La somatostatina fue administrada para inhibir la secreción de in- sulina y glucagon (1, 57, 127, 128). El efecto hipocetonémico ob- servado es independiente de la acción insulinogénica de la alani-

na ya que estas observaciones se han reproducido en sujetos normales y diabéticos (1, 57, 109, 127, 128). En experimentos de incorporación isotópica de ^{14}C -oleato exógeno a la síntesis de cuerpos cetónicos y en presencia de concentraciones importantes de alanina, se evidenció que ésta inhibe la actividad cetogénica (127, 128). El efecto hipocetonémico de la alanina es de importancia fisiológica, ya que inhibe la cetogénesis a partir de los ácidos grasos endógenos libres en la circulación (109, 127, 128).

La infusión de β -hidroxibutirato induce hipoalaninemia, la cual se debe a que disminuye la excreción de alanina desde músculo (127, 128, 154, 195). Se ha sugerido que los cuerpos cetónicos reducen la síntesis de alanina vía la inhibición de la glucólisis en músculo. En consecuencia la transaminación del piruvato accesible para formar alanina está limitada (128, 195, 210). En diferentes estados metabólicos (embarazo, diabetes, trauma, hipoglicemia cetósica) se observa que en condiciones de inanición el decremento de alanina en plasma es concomitante a la hipercetonemia desarrollada (109, 128, 195, 210).

La alanina y el aspartato son anticetogénicos. Su mecanismo de acción es que ambos aumentan la accesibilidad de oxalacetato y dirigen acetyl-CoA hacia síntesis de citrato en vez de orientarlo a cetogénesis aunque otros mecanismos pueden estar involucrados (1, 57, 109, 127).

En estado postabsortivo (12-14 horas) el 75% de la glucosa que el hígado libera deriva de glucogenolisis más que de gluconeogéne

sis. El 25-40% de la glucosa sintetizada se origina a partir de la alanina que capta el hígado (44, 45, 133). Alanina y glutamina representan, aproximadamente el 50% del nitrógeno total α -amino liberado por músculo esquelético, balance arteriovenoso negativo en músculo (41, 47, 104, 146, 154). La alanina da cuenta del 80% de los aminoácidos totales liberados por el músculo cardíaco. La extracción fraccional esplánica de alanina (incluye contribuciones de hígado, tracto gastrointestinal superior, bazo y páncreas) da cuenta del 41-48% del total de los aminoácidos captados; la extracción fraccional esplánica de glutamina es cuantitativamente comparable (44, 47, 54, 133, 154). La depuración sustancial de glutamina ocurre en el intestino; su catabolismo es fuente de nitrógeno para la síntesis de elevadas cantidades de alanina que el intestino libera a la circulación arterial (41, 44, 45, 146). La extracción fraccional de alanina por hígado da cuenta del 50% - - aproximadamente de los aminoácidos totales liberados por tejido periférico, músculo e intestino. Procede a una velocidad mayor (2 veces) que la extracción esplánica de alanina. La extracción fraccional de alanina por hígado aumenta en un 50% en ayuno de 72 horas (44, 54, 95, 118, 154). La alanina representa el 50% del potencial metabólico gluconeogénico provisto por aminoácidos (47, 57, 71, 154). El riñón excreta una fracción mínima de alanina -- 10-20 μ mol/min). El músculo libera una fracción de alanina 5-10 veces mayor (100 μ mol/min) (41, 44, 54, 154). La alanina en niveles fisiológicos estimula la gluconeogénesis en túbulos renales aislados inhibiendo la piruvato cinasa (PK) pero no otras enzimas relevantes (41).

La alanina es un aminoácido glucogénico primario (47, 54, 57, 69). Su transaminación citosólica es el paso obligatorio de entrada a la secuencia gluconeogénica (50, 69, 127, 138). La enzima L-aminoácido 2-oxoglutarato aminotransferasa específica cataliza la transferencia del grupo α -amino de la alanina al grupo α -oxo del 2-oxoglutarato (50, 69, 118, 138).



Los productos de este equilibrio reversible son el piruvato y el glutamato. El piruvato formado se carboxila oxidativamente, vía piruvato carboxilasa (PC), produciendo oxalacetato mitocondrial. Este es traslocado como malato a citoplasma en intercambio estequiométrico con α -cetoglutarato citosólico. El malato se reconvierte a oxalacetato vía malato deshidrogenasa citosólica. El oxalacetato se descarboxila y fosforila, vía fosfoenolpiruvato carboxicinasas (PEPCK), para formar fosfoenolpiruvato (PEP). Esta vía revierte la glucólisis en gluconeogénesis y glicérogénesis (50, 69, 105, 138, 152). El glutamato que deriva de la transaminación es traslocado a mitocondria en intercambio electrogénico con aspartato mitocondrial. El glutamato experimenta desaminación, vía glutamato deshidrogenasa, produciendo iones amonio libres y α -cetoglutarato (105, 127, 138, 152). La liberación de α -cetoglutarato mitocondrial (el cual es traslocado en intercambio con malato citosólico) inicia un nuevo ciclo. Suficiente malato debe ser transferido a citosol para regenerar al oxalacetato y para ser intercambiado por α -cetoglutarato intrami

tocondrial. Teóricamente la velocidad de desaminación de glutamato y de traslocación de α -cetoglutarato o ambas afectan la velocidad de transaminación de alanina y por ende el flujo gluconeogénico. La velocidad de liberación de malato mitocondrial debe ser importante para el control de la velocidad del proceso gluconeogénico completo (69, 95, 138, 152). Se ha postulado que los equivalentes reductores de malato son probablemente los responsables del aumento del cociente NADH/NAD^+ en condiciones de gluconeogénesis elevada. El malato tiene un papel dual como acarreador de electrones desde mitocondria a citosol y como precursor de PEP. El malato proporciona los equivalentes reductores para la conversión de fosfoglicerato a triosafosfato en el citosol (105, 152, 188). La lanzadera malato-aspartato transporta los equivalentes reductores desde mitocondria a citosol. Se acopla a los sistemas intra y extramitocondriales NAD^+ (NADP^+)-malato deshidrogenasa específica y aspartato aminotransferasa (118, 127, 138). Las enzimas convierten malato y aspartato, respectivamente, en oxalacetato. Su actividad aumenta, en forma concomitante, al incremento en la biosíntesis de PEP a partir de malato y aspartato (36, 105, 118, 188). El ayuno de 48 horas, la diabetes no controlada y las concentraciones excesivas de cortisona y tirosina en sangre, son condiciones que aumentan la actividad de las enzimas hepáticas alanina y aspartato aminotransferasas y deprimen la actividad de malato deshidrogenasa hepática (45, 52, 82). En el músculo esquelético estas enzimas no experimentan cambios (42, 45, 82).

En condiciones de aporte inadecuado de glucosa (ayuno, die

ta abundante en grasas, desequilibrio hormonal) la alanina asume importancia clínica en la regulación homeostática de glucosa (26, 47, 84, 154). La síntesis y la liberación de alanina desde músculo constituyen el paso limitante de la velocidad de gluconeogénesis hepática (26, 47, 84, 154). La poza intracelular de aminoácidos libres es la precursora de la síntesis de novo de alanina y glutamina (47, 82, 154). Esta poza es repletada presumiblemente por proteólisis de proteína muscular (47, 82, 154). Los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina) que derivan de proteólisis son los donadores fundamentales de los grupos α -amino requeridos para la biosíntesis de novo de alanina y glutamina (41, 44, 71, 154). La transferencia de grupos α -amino procede por desaminación o transaminación enzimáticas. El ayuno (por 48 h), la diabetes no controlada y los niveles excesivos de cortisona, estimulan la actividad de las aminotransferasas específicas de los aminoácidos ramificados en músculo (41, 44, 82). Los niveles elevados de tirosina deprimen la actividad de estas enzimas en músculo (44, 82).

La biosíntesis de novo de alanina es obvia ya que conforma sólo el 7-10% de los residuos de proteína muscular; sin embargo, da cuenta del 30-40% del flujo neto de nitrógeno (α -amino) desde músculo a cama esplánica (44, 47, 104, 133, 154). El esqueleto carbonado de alanina de novo deriva de la poza intracelular común de piruvato. Esta proviene de glucólisis y del metabolismo oxidativo de otros aminoácidos. La velocidad de producción de piruvato, a partir de aminoácidos, es el paso limitante de la síntesis

sis neta y liberación de alanina en músculo. La producción de am bos sustratos, piruvato y alanina, conserva una relación directamente proporcional; en contraste, la síntesis de glutamina mantiene una relación recíproca respecto a la velocidad de producción de piruvato (45, 52, 53, 82). La contribución de los aminoácidos provenientes de proteólisis muscular -aspartato, succinato, glutamato y aminoácidos de cadena ramificada- al esqueleto carbonado de alanina, involucra pasos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La dinámica de éste y factores que regulan el flujo (entrada y salida) de metabolitos intermedios del ciclo, desempeñan una función importante en la modulación de la síntesis y liberación de alanina y glutamina desde tejido muscular (52, 53, 82, 95).

La alanina que deriva del piruvato glucolítico en músculo se libera a sangre y es transportada a hígado. En este sitio ocurre la desaminación de alanina por la vía formación de urea y el piruvato residual es convertido a glucosa. Esta se libera a sangre y es captada por músculo donde entra a la vía glucolítica. El piruvato que deriva de ella vuelve a actuar como aceptor de grupos amino (26, 41, 118, 146, 154). La reciclación de esqueletos carbonados a través del ciclo glucosa-alanina-glucosa o ciclo de Cahill se ha evidenciado en el postabsortivo (12-14 horas), en ayuno prolongado (4-6 semanas) y después de ejercicio muscular extenuante (26, 41, 46, 47). En la fase postabsortiva el 67% de la alanina que libera el músculo deriva de glucosa; una pequeña porción del esqueleto carbonado proviene del catabolismo de otros aminoáci

dos (41, 44, 47, 154). El 18% de la glucosa que entra a músculo, cuantifica para la producción de alanina; en músculo en reposo, la contribución de glucosa corresponde a un 13%. La extracción fraccional hepática de alanina da cuenta del 6-12% de la glucosa liberada por hígado. El 20-40% de la glucosa que entra a músculo es metabolizada a lactato, como producto glucolítico final. El 15-20% de la glucosa producida en hígado es lactato-derivada (41, 44, 45, 154). El ciclo glucosa-alanina-glucosa, en la fase postabsortiva, ocurre a una velocidad cercana al 50% de la procedente por el ciclo de Cori (glucosa-lactato-glucosa) (26, 41, 44, 47). El ciclo glucosa alanina-glucosa no aporta carbono neto para la síntesis de glucosa de novo ya que en gluconeogénesis neta el piruvato deriva de precursores diferentes de carbohidratos (44, 47, 95). Su importancia radica en que contribuye a la homeostasis de glucosa, a la homeostasis de nitrógeno y al metabolismo energético (26, 28, 41, 44). El ciclo glucosa-alanina-glucosa transporta a la periferia, en forma más eficiente que el ciclo de Cori, la energía que deriva de la oxidación de grasas (26, 27, 41, 44). En virtud de que la alanina estimula la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada, el ciclo glucosa- a piruvato- a alanina genera más ATP que el ciclo glucosa- a lactato. Por cada mola de aminoácido oxidado se producen 30-40 molas de ATP adicionales (26, 27, 41, 42, 44). El ciclo glucosa-alanina-glucosa produce 8 molas de ATP y el ciclo de Cori genera 2 molas de ATP (41, 42, 44, 154). El ciclo glucosa-alanina-glucosa opera para mantener la homeostasis de glucosa cuando el suministro energético está severamente restringido. Se ha sugerido, en particular bajo

condiciones de ayuno, que el significado fisiológico del ciclo -- glucosa-alanina puede estar más relacionado a transporte de nitrógeno que a gluconeogénesis y que el enlace entre los metabolismos de alanina, lactato y glucosa se describe mejor en relación a un ciclo compuesto glucosa-alanina-Cori (26, 44, 84, 146).

En inanición prolongada (4-6 semanas) la alanina que libera el músculo deriva de los residuos de alanina incluidos en cadenas peptídicas y del esqueleto carbonado de otros aminoácidos que derivan de proteólisis muscular (44, 45, 47, 154, 195). La síntesis neta de alanina desde el metabolismo oxidativo de otros aminoácidos involucra la conversión de intermediarios de 4 carbonos -- del ciclo de los ácidos tricarboxílicos a piruvato. El piruvato formado puede experimentar oxidación completa, a bien es transaminado con glutamato para formar alanina, o de otra forma puede ser reducido a lactato (44, 47, 52, 82, 95). La transaminación de piruvato es el paso final al cual convergen todas las secuencias -- multienzimáticas de los aminoácidos precursores para la síntesis neta de alanina (47, 52, 82, 195). En inanición prolongada disminuye de forma sustancial la proteólisis extrahepática fundamentalmente en músculo. En consecuencia se reduce la liberación total e individual de los aminoácidos desde músculo a la circulación -- (26, 45, 47, 154). La declinación de alanina, en cantidades absolutas y relativas, es prominente (45, 47, 154). La concentración arterial de alanina disminuye (a menos que 1/3 los niveles que se observan en el periodo postabsortivo) y determina la reducción en la velocidad de extracción fraccional esplánica (27, 45, 47, 84).

La gluconeogénesis a partir de alanina es proporcional a la accesibilidad de ésta. Este mecanismo tiene relevancia fisiológica para mantener los niveles de glicemia sobre todo cuando el glucógeno ha sido depletado (47, 70, 84, 146). En inanición prolongada la ocurrencia de hipoalaninemia es el mecanismo regulador crucial que disminuye la conversión de proteínas a carbohidratos (44, 45, 154).

Una carga relativa de alanina oral en diabéticos que secretan insulina o en individuos normales no causa un aumento significativo de glucosa en plasma pero induce una hiperinsulinemia más prolongada que la provocada por infusión I.V. de alanina (57, 84, 128). La infusión I.V. de alanina a adultos glucógeno depletados resulta en un aumento de glucosa sanguínea. La respuesta es tardía (30-60 min) en relación a la observada por niños normoglicémicos (a los 20 min) después de la administración I.V. de alanina (26, 84, 171). Los resultados confirman la integridad de los mecanismos gluconeogénicos y definen la importancia de la alanina como sustrato limitante de la velocidad de gluconeogénesis (26, 47, 70, 154, 171).

La alanina es el principal vehículo de grupos α -amino -- que libera el intestino y músculo en una dieta habitual y en ayuno (26, 47, 69, 146). La alanina y glutamina son los responsables del flujo neto de nitrógeno amínico desde tejido periférico a cama esplánica (41, 47, 195). En contracción muscular acelerada la producción de alanina es un mecanismo que limita la respuesta hi-

peramonémica a ejercicio (44, 47, 195). Alanina y glutamina son los principales proveedores de carbono liberado desde músculo. Alanina y glutamina son fuentes potenciales energéticas (41, 44, 47, 154).

Posterior a una comida protéica o ingesta de leche en los períodos absortivo y postabsortivo aumentan los niveles sistémicos fundamentalmente de alanina y de los aminoácidos ramificados (éstos con un aumento desproporcional de 100-150%) (44, 44b). El nitrógeno α -amino total aumenta un 20%. La liberación de alanina por tejido periférico no se abate, o puede reducirse casi una hora en tejido muscular. En 4-8 horas la alanina disminuye a un nivel inferior al basal (44, 44a). Los aminoácidos ramificados persisten elevados por 8 horas (44, 44a).

Se ha demostrado que en embarazo las respuestas a inanición (hipoglicemia, hiperconetemia e hipoalaninemia) son exageradas (44, 44b). Este patrón se debe a la caída en la producción de glucosa y al aumento en los requerimientos del feto como consecuencia de la deficiencia de sustratos en la madre (44, 232). La capacidad gluconeogénica hepática a partir de sustratos exógenos está aumentada, lo cual demuestra la integridad del mecanismo gluconeogénico y la accesibilidad limitada de precursores glucogénicos endógenos (alanina) (44, 232).

La hiperglicemia típica de las lesiones sépticas puede ser la responsable del balance neto negativo de nitrógeno en estado

de "stress" máxima (7, 32, 130, 146).

En infección generalizada relativamente breve, los cambios metabólicos son prominentes en músculo esquelético. Se acelera la actividad proteolítica. Aumentan la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada y de sus α -oxoácidos derivados como soporte energético (3, 11, 130, 141). Aumenta la movilización de nitrógeno para la biosíntesis de alanina y glutamina. Se incrementa la extracción fraccional esplánica de ambos lo cual causa depleción de los niveles sistémicos de los mismos (3, 11, 31, 50, 141). En infección severa o la que progresa hasta una fase final se presenta hiperaminoacidemia donde los aminoácidos de cadena ramificada son los más elevados (3, 11, 130, 232).

Dosis suprafarmacológicas de glucagon inducen hipoaminoacidemia que involucra todos los aminoácidos, pero el más fuertemente depletado es la alanina. El glucagon estimula el transporte intracelular de aminoácidos, acelera la liberación (desde músculo) y la extracción esplánica de los mismos; estos mecanismos afectan preferentemente a la alanina (44, 57, 138, 146). La relación -- [glucagon] / [insulina], en la circulación portal, controla el metabolismo gluconeogénico; la alanina es ampliamente susceptible a la variación de este cociente (44, 57, 138, 146). La hipoalaninemia contribuye a la hiperglucagonemia que se observa durante -- ejercicio o la que se desarrolla después de la administración de glucocorticoides (44). La alanina es un potente estimulador de la liberación de glucagon (46, 57). La insulina disminuye la con

centración sistémica de algunos aminoácidos (leucina, isoleucina, metionina, tirosina, fenilalanina y treonina) vía inhibición de su liberación desde músculo; la alanina no es afectada. La administración de glucosa oral o I.V. estimula la secreción de insulina endógena la cual reduce la extracción esplánica de alanina (aumenta la concentración arterial de ésta) e inhibe por ende la gluconeogénesis (44, 146). Las catecolaminas, norepinefrina y epinefrina, en concentración elevada (10^{-5} M) inhiben la liberación de alanina y glutamina, en músculo esquelético. Agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol) reproducen esta acción y antagonistas β -adrenérgicos (propranolol) la bloquean completamente (53). En concentraciones fisiológicas (10^{-9} a 10^{-8} M) la epinefrina modula la velocidad de proteólisis en músculo (27, 53).

5. CUERPOS CETONICOS

Los cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato y acetoacetato) son sustratos importantes para el metabolismo oxidativo y determinadas vías biosintéticas en los tejidos periféricos -en especial el cerebro, los músculos esquelético, cardíaco y el diafragma (54, 58, 195, 196, 210). El β -hidroxibutirato y el acetoacetato son fácilmente interconvertibles entre sí, se tratan como una entidad suma. Su producción es aproximadamente igual a su consumo neto, por el cerebro y el riñón, más la pérdida urinaria (110, 133, 196). Los cuerpos cetónicos son también precursores lipogénicos en algunos tejidos incluyendo el cerebro del neonato, la glándula mamaria lactante y el tejido adiposo (110, 195, 196, 210, 232).

El sistema nervioso central utiliza, en forma efectiva, a los cuerpos cetónicos cuando su concentración en la sangre es del orden de mmol/l (18, 43, 171, 195). En la vida fetal temprana, el β -hidroxibutirato puede reemplazar a la glucosa como sustrato energético del metabolismo cerebral (16, 110, 140, 161). En el niño y en el neonato la entrada de los cuerpos cetónicos al cerebro es 3 veces mayor que en el adulto en niveles arteriales comparables de cuerpos cetónicos (140, 161, 232). Los cuerpos cetónicos pueden regular el suministro de los ácidos grasos al hígado. Actúan ya sea vía inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo (efecto directo) o bien vía la estimulación de la secreción de insulina (efecto indirecto) (195, 196). En cetosis fisiológica de inanición, la lipólisis excesiva es prevenida en gran parte por -

los mismos cuerpos cetónicos. En cetosis patológica este control se pierde (58, 110, 195, 196). El resultado neto del mecanismo de retroalimentación del suministro de los ácidos grasos al hígado es controlar la velocidad de cetogénesis (regulación extrahepática) y la accesibilidad del glicerol, sustrato gluconeogénico importante (195, 196, 210, 213). Los cuerpos cetónicos reducen la utilización de la glucosa y/o la oxidación del piruvato en los tejidos incluyendo el corazón, el diafragma, la glándula mamaria -- lactante, el riñón y el cerebro (154, 166, 195, 196). Los cuerpos cetónicos pueden influir indirectamente en la vía gluconeogénica limitando el suministro de alanina, de lactato y de glicerol (154, 195, 196, 210). Los cuerpos cetónicos aumentan la producción de piruvato y de lactato vía aumento del cociente mitocondrial $[\text{acetil-CoA}] / [\text{CoA}]$ que inactiva al complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC) (19, 139, 196). Los cuerpos cetónicos son -- fuente energética alternativa en los tejidos corporales cuando la ingesta de carbohidratos en la dieta es mínima o bien cuando éstos no pueden ser utilizados efectivamente (58, 110, 111). En -- inanición prolongada los cuerpos cetónicos son fuente potencial -- de respiración en especial del sistema nervioso central; su elevada oxidación cubre el 50-60% de los requerimientos energéticos totales del cerebro desplazando a la oxidación de glucosa (1, 54, 110, 154, 171). La oxidación acelerada de los cuerpos cetónicos provee un mecanismo para mantener la homeostasis de la glucosa ya que reduce la demanda de ésta en los tejidos periféricos; y en -- forma concomitante, ejerce un efecto de economía de proteínas ya que los cuerpos cetónicos inhiben la proteólisis del tejido muscu

lar, principalmente, reduciendo la liberación de alanina lo cual conduce a una relación inversa entre las concentraciones de los cuerpos cetónicos y de la alanina en sangre (1, 48, 58, 110, 127, 195). La hipoalaninemia resultante produce una marcada declinación de la gluconeogénesis hepática (1, 48, 127, 195). Un aumento de los cuerpos cetónicos en sangre se asocia con niveles aumentados de lactato y de la relación lactato/piruvato (L/P) y con una caída en las concentraciones de alanina y piruvato sanguíneos (1, 48, 128, 215). La relación inversa entre alanina y el metabolismo de los cuerpos cetónicos tiene importancia en la regulación de estados de "stress" donde ocurren marcadas desviaciones de la relación fisiológica normal del metabolismo de proteínas y del metabolismo de grasas (1, 48, 128). La velocidad de utilización de los cuerpos cetónicos como sustratos oxidables o lipogénicos depende de la accesibilidad de éstos en la circulación (105, 196, 199, 211). Diversas condiciones fisiológicas, patológicas o nutricionales que incrementan la velocidad de la cetogénesis hepática inducen hipercetonemia (58, 196). Son ejemplos, la inanición prolongada, la diabetes, el embarazo avanzado (cuando las demandas metabólicas del feto aumentan), la lactancia en su fase inicial (cuando más glucosa es requerida por la glándula mamaria para la síntesis de componentes de la leche), la insuficiencia de insulina, los estados traumáticos y la hipoglicemia cetósica (58, 128, 195, 196, 210).

La infusión continua de cuerpos cetónicos en individuos en

ayuno (hipercetonemia inducida) causa hipoalaninemia y se acompaña de reducción en la excreción de nitrógeno, previene el balance negativo de nitrógeno en el músculo esquelético (109, 127, 154, - 195). Varios autores han sugerido que los cuerpos cetónicos disminuyen la producción de alanina por el músculo vía inhibición de glucólisis con la consecuente limitación de la poza de piruvato a ser transaminada (128, 154, 195, 210). Los cuerpos cetónicos pueden iniciar la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada (donadores primarios de nitrógeno para la síntesis de alanina) en músculo, función que se postula como otro posible mecanismo de la influencia de los cuerpos cetónicos en la proteólisis muscular -- (44, 154, 195). La alanina y el aspartato ejercen un efecto anti cetogénico (1, 57, 109, 127). La administración I.V. de alanina a individuos insulina-glucagon deprimidos, por la acción de somatostatina, induce hipocetonemia (1, 48, 57, 128). La desaminación oxidativa de la alanina a piruvato y la subsecuente conversión de éste a lactato o a glicerofosfato causan posiblemente el efecto anticetogénico de la alanina (57, 109, 127). Se ha sugerido la existencia de un ciclo de modulación recíproca entre los cuerpos cetónicos y la alanina en el cual ambos sustratos influyen entre sí de manera compatible. Este ciclo de realimentación puede tener implicaciones fisiológicas ya que representa el enlace entre los metabolismos de lípidos, de glucosa y de proteínas (48, 128). En inanición breve el ciclo puede proveer un balance adecuado entre cetogénesis y gluconeogénesis como mecanismos complementarios para suplir la deprivación de alimentos (48, 128). Los efectos hipocetonémicos de la alanina pueden ocurrir en ausencia de cam--

bios importantes de otros metabolitos en sangre incluyendo la glucosa, el lactato y el piruvato (48, 127, 128).

Estudios de cateterización en humanos expuestos a inanición por varios días presentan que la extracción fraccional hepática de ácidos grasos no esterificados plasmáticos es aproximadamente de 89 mg/min por 1.73 m^2 (resultados expresados por área corporal). Una fracción se libera como triacilgliceroles (34 mg/min por 1.73 m^2). Otra porción (50 mg/min por 1.73 m^2) experimenta oxidación parcial a β -hidroxibutirato y acetoacetato y da cuenta aproximadamente del 75% de la energía total que deriva de la oxidación de ácidos grasos en el hígado. La cetogénesis, vía β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMGCoA), genera $750 \mu\text{mol/min}$ por 1.73 m^2 de cuerpos cetónicos y una cantidad equivalente de H^+ . El equilibrio β -hidroxibutirato \leftrightarrow acetoacetato es dependiente del cociente NADH/NAD^+ . Una fracción ($636 \mu\text{mol/min}$ por 1.73 m^2 , aproximadamente el 85%) de los cuerpos cetónicos producidos se oxida a CO_2 y H_2O en el tejido periférico y libera una cantidad igual de H^+ . El H^+ producido da cuenta del 6-7% del total del hidrógeno (iones hidronio o hidruro) liberado por la oxidación de lípidos en condiciones de inanición. La descarboxilación espontánea del ácido acetoacético en acetona y CO_2 y su excreción subsecuente elimina H^+ del cuerpo. La acetona se libera vía respiración ($13 \mu\text{mol/min}$ por 1.73 m^2) y por orina ($1.2 \mu\text{mol/min}$ por 1.73 m^2) con la excreción concomitante de H^+ . El aumento en la actividad de H^+ (poza común generada de lipólisis, de β -oxidación y de la vía HMGCoA) se neutraliza por la poza de HCO_3^- (poza nor-

mal de 800-900 nmol/min por 1.73 m^2 a pH arterial de 7.42). La excreción renal de β -hidroxibutirato ($65 \mu\text{mol/min}$ por 1.73 m^2) y de acetoacetato ($15 \mu\text{mol/min}$ por 1.73 m^2) genera HCO_3^- , depura NH_4^+ y H^+ , todos en cantidades equimolares. Los cuerpos cetónicos contribuyen a mantener la neutralidad electrolítica de los fluidos extracelulares (en desequilibrio por la pérdida de HCO_3^-) y previenen la acidosis metabólica (vía aumento de la reabsorción renal de cuerpos cetónicos) en hipercetonemia de inanición. En inanición la pérdida renal de Na^+ puede causar severa deshidratación (21, 54, 106).

Los ácidos grasos no esterificados de cadenas largas (NEFA) que derivan de la movilización de triacilglicerol desde el tejido adiposo y se liberan a la circulación, son los precursores inmediatos y principales de los cuerpos cetónicos en el hígado vía β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMGCoA) (58, 106, 107, 195). Los acilgliceroles hepáticos y las lipoproteínas plasmáticas (ricas en triacilglicerol y presentes ya sea en quilomicrones o en lipoproteínas de muy baja densidad) no contribuyen a mantener el metabolismo hepático ni la vía cetogénica (106, 107, 110, 162). La regulación intrahepática que este tejido ejerce sobre la extracción fraccional de NEFA, dependiente de su concentración plasmática, se relaciona con el "status" de carbohidratos -la cantidad de glucógeno en el hígado y la dirección predominante del flujo de carbono (glucólisis y lipogénesis contra gluconeogénesis)- e influye en la velocidad de cetogénesis ya que los cuerpos cetónicos sólo se forman si son requeridos (1, 111, 113, 162, 195). En inani

ción la cetogénesis incrementada se correlaciona con la depleción de glucógeno hepático y con la apertura de la vía gluconeogénica. La lipólisis en el tejido adiposo es un factor importante que determina la velocidad de cetogénesis. La lipólisis del tejido adiposo responde a efectos adrenérgicos y hormonales (principalmente, insulina) y puede estar influenciada por la concentración de glucosa (1, 109, 112, 113, 195, 210). El sitio primario de regulación intrahepática de cetogénesis es a nivel de disposición de las cadenas largas acil-CoA derivadas entre esterificación con glicerol 3-fosfato (síntesis de triacilgliceroles y de fosfolípidos) y la entrada a mitocondria vía carnitina acil-transferasa (síntesis de acilcarnitina-ésteres) (1, 106, 110, 195, 210, 211). La actividad de la carnitina acil-transferasa hepática es baja durante alimentación y aumenta, en forma marcada, en ayuno debido aparentemente al aumento en la concentración de la carnitina hepática (105, 109, 110, 162). Los ácidos grasos de cadenas corta y media (octanoato, butirato) no forman triacilgliceroles y no requieren del sistema carnitina acil-transferasa para entrar a la mitocondria (109, 195, 210, 213). En privación de alimentos la actividad de la enzima mitocondrial glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) disminuye casi un 40%. La enzima cataliza la primera reacción de la síntesis de triglicéridos a partir de glicerol-3-fosfato y de acetil CoA (9, 106, 107, 210). Una fracción considerable de cadenas largas de ácidos grasos acil-CoA derivadas se oxida a CO_2 y a cuerpos cetónicos (10, 106, 111, 113, 210, 213). En realimentación, en la fase crítica de lactación y en la perfusión hepática con insulina, aumenta la actividad de GPAT y conse-

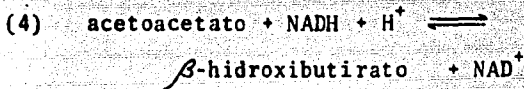
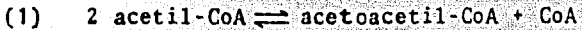
cuentemente se estimula la velocidad de esterificación (9, 106, 108, 113). Es posible que la GPAT mitocondrial compita con la síntesis de acilcarnitina por la poza de cadenas largas de ácidos grasos acil-CoA en el espacio intermembranal de la mitocondria (106, 108, 113, 210). Se ha demostrado que ocurre una relación inversa entre las vías de esterificación y de oxidación de los ácidos grasos no esterificados plasmáticos (107, 108, 210). La carnitina aciltransferasa I (localizada en el lado más externo de la membrana mitocondrial interna) cataliza el paso limitante de la oxidación de los NEFA (1, 106, 113, 195). La enzima cataliza la síntesis de acilcarnitina ésteres, es estimulada por carnitina y es inhibida por malonil-CoA en niveles fisiológicos (1, 113, 195, 210, 211). En alimentación los niveles incrementados de malonil-CoA se correlacionan directamente con el aumento en la velocidad de lipogénesis, la cual en turno es dependiente del suministro de precursores de carbohidratos -glucógeno, glucosa, lactato y piruvato-, y se relaciona inversamente con la síntesis de acilcarnitina y por ende con la velocidad de oxidación de los NEFA y de cetogénesis (1, 44, 110, 112, 195, 211).

El segundo sitio de regulación intrahepática de cetogénesis es a nivel de la disposición de acetil-CoA entre síntesis de acetoacetil-CoA, vía HMGC_oA, y la síntesis de citrato, vía citrato sintasa (CS) mitocondrial (1, 106, 110, 210, 211). El acetil-CoA puede seguir una variedad de vías incluyendo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la vía lipogénica y las reacciones de HMGC_oA (94, 106, 110). El citrato puede incorporarse al ciclo de

los ácidos tricarboxílicos o bien utilizarse como fuente de acetil-CoA para procesos extramitocondriales -la síntesis de ácidos grasos y colesterogénesis- (127, 195, 210, 211, 213). La competencia de CS por acetil-CoA depende de la accesibilidad del oxalacetato. Varios factores determinan la concentración intramitocondrial del oxalacetato: a) la relación $[NAD^+] / [NADH]$ en la matriz mitocondrial a través del sistema redox malato deshidrogenasa (MDH); b) la velocidad de síntesis de oxalacetato vía piruvato carboxilasa (PC); y c) la velocidad de utilización del oxalacetato vía fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) para suministrar fosfoenolpiruvato (110, 127, 210). En condiciones gluconeogénicas, si la velocidad de suministro de precursores de glucosa (alanina) es menor que la capacidad del hígado para sintetizar fosfoenolpiruvato (desde oxalacetato) la concentración de oxalacetato permanece baja permitiendo que la acetil-CoA-acetiltransferasa (primera reacción de la vía cetogénica) compita con la CS por la poza de acetil-CoA. Si aumenta la liberación de los precursores gluconeogénicos a hígado, la velocidad de formación del oxalacetato se aproxima o excede a su velocidad de utilización y la poza incrementada de oxalacetato y del acetil-CoA se dirigirán a la síntesis de citrato (210, 213). La cetogénesis es inhibida cuando la velocidad de suministro de precursores gluconeogénicos en el hígado mantiene una velocidad adecuada de producción de glucosa. La velocidad máxima de producción de cetonas y de glucosa no procede simultáneamente (106, 109, 112, 210).

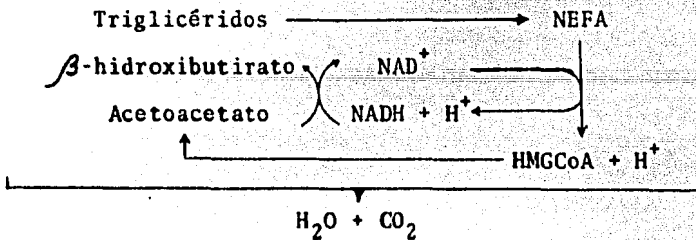
La síntesis de los cuerpos cetónicos ocurre vía ciclo β -hi

droxi- β -metilglutaril-CoA (HMGCoA). Las reacciones involucradas son:

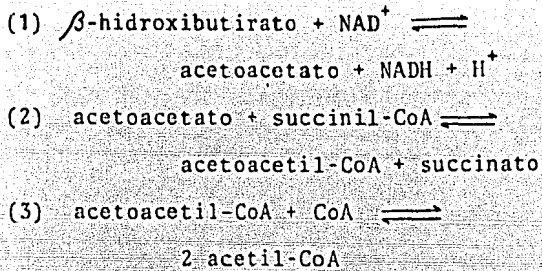


Las enzimas de esta secuencia metabólica incluyen la acetoacetil-CoA tiolasa, la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA sintasa, la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA liasa y la β -hidroxibutirato deshidrogenasa, respectivamente. Las 4 enzimas se encuentran en el hígado y en otros tejidos (ej. corazón, riñón e intestino) (106, 110, 198). La enzima acetoacetil-CoA tiolasa presenta dos formas, A y B. La A, presente únicamente en hígado y en riñón, cataliza la síntesis de acetoacetil-CoA y la enzima B cataliza la reacción contraria (210, 212). Ya que la concentración de acetoacetil-CoA en la mitocondria hepática es casi similar al K_i para la enzima, los cambios en la concentración de acetoacetil-CoA pueden determinar el flujo a través de la vía de HMGCoA, específicamente a nivel de inhibición de la enzima β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA sintasa por acetoacetil-CoA (210, 212, 213). La concentración de acetoacetil-CoA está afectada por 2 enzimas: la β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (cataliza el equilibrio redox entre el acetoacetil-CoA y el β -hidroxibutiril-CoA) y la enzima succi-

nil-CoA- β -oxoácido-CoA transferasa (reacción entre acetoacetyl-CoA y el succinato para formar succinil-CoA y acetoacetato). La actividad de la succinil-CoA- β -oxoácido-CoA transferasa es la primera reacción para la utilización de acetoacetato por los tejidos periféricos; en el hígado no ocurre utilización neta de acetoacetato (210, 212, 213). Las reacciones (1) y (4) son pasos comunes en la producción y utilización de los cuerpos cetónicos (110, 198, 199). La conversión de acetoacetato en β -hidroxibutirato regenera NAD^+ (conversión de equivalentes reductores al estado oxidado) y permite que la velocidad de β -oxidación de los NEFA sea continua, amplificando la respuesta cetogénica que cubrirá los requerimientos del hígado y de otros tejidos periféricos (106, 107, 135).



El destino primordial de los cuerpos cetónicos es su oxidación vía ciclo de los ácidos tricarboxílicos (110, 196, 198, -- 200). La secuencia enzimática de reacciones involucra la β -hidroxibutirato deshidrogenasa, la 3-oxoácido-CoA transferasa y la acetoacetyl-CoA tiolasa (110, 196, 199, 200). El paso limitante e inicial de la velocidad de utilización de los cuerpos cetónicos en el tejido periférico es la reacción (2) (94, 107, 199, 212).



La acetoacetil-CoA tiolasa citosólica regula la utilización extramitocondrial de los cuerpos cetónicos (196, 199, 200). El acetoacetil-CoA que deriva del acetoacetato debe ser reconvertido en acetoacetato por la acción combinada de la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA sintasa y la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA liasa. Se ha sugerido que este ciclo entre el acetoacetil-CoA y el acetoacetato puede ser importante en la regulación de cetogénesis (110, 196, -- 198, 212). El metabolismo oxidativo de los cuerpos cetónicos tiene elevada actividad en el tejido cerebral fetal y del neonato, en el riñón, en el corazón y el tejido interescapular café (58, 140, 161, 199). El tejido adiposo tiene una amplia capacidad de emplear los cuerpos cetónicos como sustratos termogénicos (58, 140, 161, - 196). En la corteza cerebral de cobayos el metabolismo oxidativo de los cuerpos cetónicos previene la utilización de glucosa, aumenta la formación de lactato (de interés fisiológico en la economía de glucosa) y da cuenta del 20-40% de la velocidad de consumo de oxígeno por este tejido (150). Son sitios de incorporación de cuerpos cetónicos al metabolismo lipogénico la médula espinal, y el cerebro en desarrollo, el tejido interescapular café de fetos y adultos (presenta una velocidad de incorporación mayor que en teji

do cerebral) y la glándula mamaria lactante (106, 195, 196, 210).

El hígado es el único órgano que contribuye a la producción y liberación de los cuerpos cetónicos al torrente sanguíneo. El riñón, el cerebro y el músculo son los tejidos que depuran, en forma importante, cuerpos cetónicos sanguíneos (54, 105, 133, 134, -- 199). La capacidad cetogénica hepática, a partir de los ácidos -- grasos no esterificados (NEFA), varía de acuerdo a las condiciones fisiológicas, al estado nutricional y al estado reproductivo. En el embarazo y en las fases iniciales de lactación ocurre lipogénesis. Las lipoproteínas de muy baja densidad que derivan de los -- triacilgliceroles hepáticos, son captadas (vía lipoproteínlipasa) por el tejido adiposo (en embarazo) y por la glándula mamaria (en lactación) (1, 195, 211). La respuesta metabólica a inanición (24 h) con respecto al aumento en cetogénesis es más pronunciada en la fase crítica de lactación y en embarazo, estado en el que hay mayor susceptibilidad de desarrollar cetonemia(211). En inanición -- prolongada (>3 días) el control de la respuesta hipercetonémica radica en: la velocidad de producción de los cuerpos cetónicos; la -- depuración por tejido periférico en especial por el músculo; la -- concentración relativamente baja de los cuerpos cetónicos durante los 3 primeros días de ayuno; la accesibilidad de los NEFA; la interrelación de varios factores hormonales (insulina y glucagon); y la inhibición por producto final (27, 54, 110). El metabolismo de los carbohidratos y de grasas está íntimamente acoplado en el hígado. El malonil-CoA desempeña un papel crítico en la coordinación del flujo de carbono a través de estos sistemas interrelacionados.

El malonil-CoA constituye un parámetro importante de control metabólico de carbohidratos, de la oxidación de grasas y de la producción de los cuerpos cetónicos en el hígado (54, 106, 110, 195). Durante un proceso infeccioso la cetogénesis parece estar inhibida. Aumenta el transporte de los ácidos grasos de cadena larga, media y corta a la mitocondria hepática. Se incrementa la síntesis de triacilgliceroles y su movilización y la de otros lípidos en plasma (11, 13, 189). La β -oxidación es normal, pero la utilización del acetyl-CoA para la síntesis de cuerpos cetónicos está deprimida (11, 13, 189).

La utilización de los cuerpos cetónicos por el cerebro y el riñón es proporcional a la concentración de los mismos en la circulación arterial; en el músculo esquelético no ocurre esta dependencia (54, 134). En inanición los tejidos cerebral y renal captan cantidades adicionales de cuerpos cetónicos. El sistema nervioso central consume 32 g/día de β -hidroxibutirato, 6 g/día de acetoacetato y 54 g/día de glucosa en inanición prolongada (54, 133, 171). El riñón emplea fundamentalmente glucosa, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos y aminoácidos para cubrir su acelerado ritmo metabólico respiratorio (96). La extracción fraccional renal de β -hidroxibutirato (49 g/d) equivale a la cantidad de β -hidroxibutirato que libera el tejido esplánico (54, 133). El riñón y el tejido esplánico liberan 37 g/d de acetoacetato (133). La excreción de cuerpos cetónicos urinarios en ayuno mayor de 3 días (0.6 g/d) representa aproximadamente el 5% del valor que se observa después de 5-6 semanas de ayuno (54). En ayu-

no prolongado la eliminación de cuerpos cetónicos ocurre concomitante con la excreción de NH_4^+ , ésta cuantifica con el 42% del nitrógeno total liberado (133, 154). Asumiendo que los cuerpos cetónicos dan un valor calórico aproximado de 4.5 kcal/g se ha calculado que el consumo de éstos por el músculo esquelético durante inanición breve asciende a 75 g/d (54). En el postabsortivo (12-14 hrs) la oxidación de los cuerpos cetónicos da cuenta del 10% del consumo total de oxígeno por el músculo esquelético. En ayuno de 3-7 días aumenta la producción esplánica de los cuerpos cetónicos (115 g/d) y su oxidación provee el 50-85% de los requerimientos energéticos del músculo. En ayuno de 24 días declina la captación neta de cuerpos cetónicos (posiblemente da cuenta del 1-16% del metabolismo energético muscular) y en forma paralela la producción esplánica de los mismos se reduce (83 g/d) (27, 54). La velocidad de utilización de cuerpos cetónicos declina en actividad muscular y en anoxia, condiciones en que aumenta la glucólisis muscular (26, 54, 105). El metabolismo oxidativo del músculo cardíaco está soportado por los ácidos grasos libres y en menor extensión participan los cuerpos cetónicos y la glucosa (171). Los cuerpos cetónicos difunden desde la sangre, con mayor rapidez que los ácidos grasos, a las células musculares (96). Los cuerpos cetónicos atraviesan libremente el tejido placentario con un gradiente materno de 2 a 1, aproximadamente. En las primeras horas después del nacimiento la poza limitante de glucógeno hepático se depleta, los niveles sanguíneos de glucosa caen, se inicia la movilización de lípidos (poza que representa el 10-15% del peso corporal del bebé) y ascienden los niveles arteriales de glice

rol y de los NEFA (cubren el 80% de los requerimientos energéticos). Esta adaptación metabólica se refleja por un aumento progresivo de cuerpos cetónicos en la circulación arterial, los niveles máximos se observan al segundo y tercer día (40, 58, 79, 140, 232). Los cuerpos cetónicos son sustratos oxidables en tejidos periféricos y regulan la lipólisis del tejido adiposo (40, 79, 140, 232).

La acumulación de cuerpos cetónicos en el torrente sanguíneo refleja desequilibrios entre la velocidad de producción y velocidad de utilización de los mismos (54, 133, 134). En diabetes mellitus ocurre una correlación lineal entre los niveles de aminoácidos de cadena ramificada y la concentración sanguínea de los ácidos grasos, de los cuerpos cetónicos y del glicerol (51, 220). Aumenta la velocidad de gluconeogénesis (acelerada formación de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato), disminuye la síntesis de citrato permitiendo que el exceso de acetil-CoA se dirija hacia cetogénesis (127, 220). El desarrollo de hiperglicemia y cetonemia en pacientes diabéticos privados de insulina es exagerado cuando la secreción de glucagon es bloqueada por la infusión de somatostatina (110). La administración de glucagon a pacientes diabéticos estimula la respuesta cetogénica (110). La movilización de los NEFA desde el tejido adiposo hasta el hígado resulta de la deficiencia de insulina; y la activación de la oxidación de los NEFA y de la cetogénesis es estimulada por la relación incrementada [glucagon] / [insulina] en plasma (110, 111). El desarrollo de cetosis in vivo requiere de una depresión absoluta de -

los niveles de insulina y promueve la liberación acelerada de los ácidos grasos al hígado (110, 111, 213). El efecto antipolítico de la insulina es mayor que la acción lipolítica del glucagón; contrariamente, la habilidad del glucagón para estimular la liberación de glucosa hepática excede, en forma muy importante, a la capacidad de la insulina para retardar este proceso (110, 112). Se ha reportado que la vasopresina, las catecolaminas, la tirosina, los glucocorticoides y la hormona del crecimiento están involucradas en la regulación de cetogénesis (1, 86, 210). La infusión de pequeñas cantidades de adrenalina y noradrenalina causa una elevación significativa en los niveles sanguíneos de cuerpos cetónicos aunque el efecto tiene una vida media corta (1, 86). Los niveles de β -hidroxibutirato y de acetoacetato, así como de β -hidroxibutirato más acetoacetato, no varían, de forma significativa, si la medición se efectúa en sangre arterial o venosa (234).

6. CITRATO

El citrato es un metabolito clave del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El citrato predomina en la fracción plasmática (64-82%), una fracción menor se distribuye en los eritrocitos -- (18-36%) (39, 96, 124). El citrato conforma el 1%, aproximadamente, del peso de mineral óseo seco, estando la mayor parte asociado con iones sodio (Na^+) aunque también se encuentran citratos cálcicos (192). El citrato es sintetizado dentro de la matriz mitocondrial, pero las enzimas sensibles a la regulación alostérica por citrato están localizadas en el citosol; por tanto, la concentración de citrato en plasma puede reflejar la concentración citosólica del mismo en prioridad al nivel total de citrato en los tejidos (122, 123). En virtud de la elevada concentración intramitocondrial de citrato, este puede ser transportado fácilmente a citoplasma, situación que explica su importancia relevante en la biosíntesis de grasas (101, 118, 122, 195). Se ha descrito la existencia de un acarreador tricarbóxilato, en membrana mitocondrial interna, para la transferencia de citrato al espacio citosólico (36, 96, 195). El citrato es capaz de atravesar las membranas celulares de varios tejidos; se ha reportado, en el hombre, la liberación de citrato a través del músculo en reposo y la entrada de citrato a hígado (122).

Durante ejercicio submáximo continuo -actividad muscular durante entrenamiento físico o bien inducida por asma- ocurre una disminución en la producción y en los niveles del lactato que se

acumula en sangre o en músculo; se reduce la depleción de glucógeno hepático y muscular; y se incrementa la accesibilidad de los ácidos grasos libres, como soporte energético primordial de músculo. La concentración de lactato se correlaciona inversamente a los niveles incrementados de citrato en plasma. Se ha postulado que el aumento de citrato en plasma, proporcional a la intensidad del ejercicio, constituye uno de los mecanismos importantes para el control de la acumulación de lactato (72, 122, 125, 149). La relación recíproca entre citrato y lactato, sugiere ampliamente que los niveles de citrato en plasma reflejan la concentración citosólica del mismo en músculo (122). El decremento de citrato en citoplasma muscular es similar a la entrada de este metabolito al plasma. En la etapa previa a actividad muscular, la concentración de citrato en sangre completa no varía en forma importante (72, 122, 125).

Debido a que la actividad de las enzimas limitantes de la velocidad de glucogenolisis y de glucólisis (con excepción de la hexocinasa, HK) no cambia significativamente durante trabajo muscular, se postula que la variación en la concentración intracelular de los moduladores de dichas enzimas, contribuye a la adaptación metabólica de economía de glucosa. Los moduladores enzimáticos -ATP, AMP, NH_4^+ , IMP, creatina-fosfato, glucosa 6-fosfato, fructosa difosfato, P_i , citrato- ocupan una posición central en el curso del metabolismo y proveen enlaces no formales entre el proceso metabólico y las enzimas regulatorias clave; su concentración varía relativamente poco en orden a mantener la integridad -

de su función dual en la célula, ya que actúan como moduladores metabólicos (dan información de los cambios en el metabolismo) o bien como intermediarios metabólicos (forman parte de alguna vía metabólica) (72, 149, 227, 229). Estudios in vitro indican que el citrato, en concentración $10 \mu\text{mol/l}$, causa una depresión importante de la enzima fosfofructocinasa muscular y por ende de la actividad glucolítica, en virtud de la acumulación de glucosa 6-fosfato que es un inhibidor de la enzima hexocinasa (55, 72, 122, 149, 196).

La biosíntesis de citrato procede por condensación aldólica entre el grupo metilo del acetyl-CoA y el grupo carbonilo del oxalacetato, con hidrólisis del enlace tioéster y la formación de CoA-SH libre. Esta reacción, catalizada por citrato sintasa, representa la primera etapa condicionante del flujo de intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarbónicos; su velocidad está determinada, en forma importante, por la disponibilidad de acetyl-CoA y de oxalacetato; así como también por la concentración de succinil-CoA, el cual compite con el acetyl CoA inhibiendo de esta forma a la citrato sintasa. La enzima citrato sintasa es inhibida por ATP, NADH y por los ésteres acil-CoA de ácidos grasos de cadenas largas (96, 118, 152, 195, 210).

La poza metabólica de acetyl-CoA deriva de varios mecanismos intramitocondriales, incluyendo: a) la descarboxilación oxidativa de piruvato (vía piruvato deshidrogenasa, PDHC); b) la β -oxidación de los ácidos grasos; y c) el metabolismo oxidativo

de los cuerpos cetónicos, β -hidroxibutirato y acetoacetato, -- (vía reacciones: β -hidroxibutirato deshidrogenasa, 3-oxoácido-CoA transferasa y acetoacetyl-CoA tiolasa). El acetoacetato es un precursor directo del acetyl-CoA (vía acetoacetyl-CoA tiolasa citosólica), el cual es requerido para la biosíntesis de ácidos grasos; este mecanismo desplaza a la traslocación de citrato desde matriz mitocondrial, deprimiendo el flujo de grupos acetyl a citoplasma. Esta vía metabólica se ha demostrado in vitro, en cerebro de animales lactantes, empleando sistemas que bloquean la incorporación de [14 C]-glucosa y de β -hidroxibutirato en lípidos -inhibidores de ATP-citrato liasa, o bien inhibidores del transporte de citrato, a través de membrana mitocondrial- sin afectar la incorporación de acetoacetato y acetato (4, 36, 43, -195, 196, 210).

La accesibilidad de oxalacetato intramitocondrial está de terminada por la velocidad de su síntesis (vía piruvato carboxilasa, PC) y la velocidad de su utilización (en la síntesis de -- fosfoenolpiruvato, mecanismo gluconeogénico) (210, 211). El par redox $[NAD^+]/[NADH]$, en matriz mitocondrial, influye en la concen tración de oxalacetato vía equilibrio malato deshidrogenasa. Con un exceso de ácidos grasos en la poza metabólica (oxidación acce lerada) concomitante a la reducción incrementada de los pares -- redox NAD-dependientes (mal/oxa, L/P), disminuye la accesibili-- dad de oxalacetato, en virtud de que aumenta su conversión a mala to y/o debido a que se estimula la actividad gluconeogénica; la vía citrato sintasa se encuentra inhibida, situación que explica

la disminución de la entrada de acetyl-CoA al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (44, 95, 138, 152, 210). La velocidad de suministro de precursores gluconeogénicos (alanina) determinará, en este caso, la velocidad de biosíntesis de oxalacetato; si ésta se aproxima o excede a la capacidad de utilización del mismo, la poza de oxalacetato consecuentemente aumentará y el acetyl-CoA - accesible se empleará para síntesis de citrato (152, 210). Sin embargo, si la liberación de sustratos gluconeogénicos es inferior a la capacidad de formación de fosfoenolpiruvato, la poza de oxalacetato permanece baja y el acetyl-CoA es dirigido hacia cetogénesis. La primera enzima de la vía cetogénica, acetyl-CoA acetyl transferasa, compite con la citrato sintasa (CS) por la disponibilidad de acetyl-CoA (36, 127, 195, 210).

En una dieta habitual el citrato puede utilizarse para la oxidación de unidades de dos carbonos (a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos); o bien, como fente de acetyl-CoA (vía citrato liasa (CL) citosólica) para procesos extramitocondriales incluyendo la biosíntesis de ácidos grasos y la colesterogénesis (96, 127, 195, 210). Las enzimas lipogénicas primarias, que se involucran en la síntesis de novo de los ácidos grasos, son la - piruvato carboxilasa (PC), ATP-CL, la acetyl-CoA carboxilasa y - la sintetasa de los ácidos grasos (36, 101, 195, 196). Estudios de diferenciación lipogénica en preadipocitos (fibroblastos mutantes que expresan el fenotipo bioquímico y morfológico de un adipocito) han evidenciado que la actividad de la enzima PC se incrementa, en relación cerrada, con la acumulación de grasas y

con la actividad de citrato liasa (CL). La actividad de PC es de importancia significativa en lipogénesis, fundamentalmente -- del tejido adiposo, en el cual una proporción sustancial del NADPH requerido se incrementa vía ciclo malato trashidrogenación (101, 195, 196, 210). La producción de NADPH se acopla al -- transporte de unidades acetilo, desde matriz mitocondrial a cito plasma; este último está determinado por la actividad de ATP-citrato liasa (CL) que escinde la molécula de citrato en acetil-CoA y oxalacetato (36, 101, 188, 195, 210). La actividad de la enzima ATP-citrato liasa aumenta durante alimentación y en dieta rica en carbohidratos; disminuye en ayuno y diabetes (192).

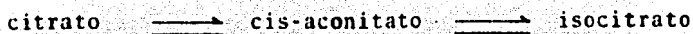


Se ha postulado que el oxalacetato, producido vía citrato liasa, experimenta reducción a malato (vía malato deshidrogenasa); luego, éste se descarboxila (vía enzima málica) produciendo piruvato y NADPH. Así, la función lipogénica requiere de la actividad anaplerótica continua, atribuida a PC, de la poza de oxalacetato intramitocondrial (101, 108, 118, 188). El citrato actúa como efector alostérico positivo de la enzima acetil-CoA carboxilasa (enzima citosólica, biotina-dependiente, cataliza el paso limitante e inicial de velocidad en la secuencia biosintética de los ácidos grasos) (7, 36, 118, 129, 206). El citrato es la -- fuente principal de acetil-CoA citoplasmático; es el precursor -- más importante de la vía lipogénica (7, 118, 210). Investigaciones in vitro enfatizan que el citrato es un modulador de las

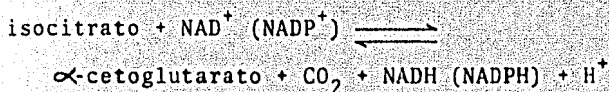
enzimas clave en los metabolismos de glucosa y de ácidos grasos; en células intactas humanas esta función permanece aún incierta (123).

Si la captación de nutrientes es superior a los requerimientos metabólicos, exceso nutricional, aumenta la actividad lipogénica, la glucosa (transformada en lípidos) se almacena en el tejido adiposo. La transaminación directa de los aminoácidos en el ciclo de Krebs, eleva la poza de citrato mitocondrial, siendo éste, sustrato potencial de la citrato liasa (36, 118). En inanición, la velocidad de utilización de citrato en el ciclo de Krebs permanece virtualmente inalterada; pero la liberación de citrato como precursor lipogénico es deprimida, en forma transitoria, lo cual contribuye a mantener una baja actividad de acetil-CoA carboxilasa y por ende el flujo lipogénico resulta inhibido. Se ha documentado que en esta condición gluconeogénica, aumenta la concentración de fosfoenolpiruvato en ambos compartimientos, citosólico y mitocondrial. En virtud de que el fosfoenolpiruvato es también sustrato para el acarreador tricarbóxilato de la mitocondria, su concentración elevada inhibe competitivamente a la traslocación de citrato, contribuyendo así a que éste sea captado, en forma primordial, por el ciclo de Krebs (127, 188, 210, 212).

La enzima aconitasa cataliza la interconversión reversible de citrato y del isocitrato vía el intermediario cis-aconitato enlazado al enzima. La mezcla en equilibrio contiene, aproximadamente, un 93% de citrato y sólo un 7% de isocitrato.



El isocitrato se oxida muy rápidamente en la etapa siguiente del ciclo de Krebs (vía isocitrato deshidrogenasa NAD-dependiente) - favoreciendo el desplazamiento de la reacción de la aconitasa -- hacia la formación de isocitrato (96, 118, 192). La enzima aconitasa contiene Fe^{++} y requiere de glutatión reducido o de cisteína; cataliza la adición reversible de H_2O al doble enlace del aconitato, desplazando el equilibrio hacia formación de citrato, o bien en dirección hacia isocitrato (96, 118, 192). La isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (mitocondrial) cataliza la -- oxidación de isocitrato en el ciclo de Krebs; la actividad de la enzima está sometida a regulación alostérica por ATP y AMP. Si el



ATP aumenta, la deshidrogenasa se inhibe, el citrato se acumula y abandona la mitocondria. Si el AMP aumenta, la enzima es activada y promueve el flujo total del ciclo de Krebs. La isocitrato deshidrogenasa es una enzima clave en la regulación de la proporciones globales de reducción y biosíntesis de los ácidos grasos (96, 118, 192).

En ayuno prolongado, la concentración incrementada de citrato plasmático es inhibitoria de la actividad de la enzima -- fosfofructocinasa (PFK), mecanismo que representa una adaptación metabólica importante en la regulación de la homeostasis de glucosa (55, 123, 227). El aumento de citrato en plasma puede ser una medida útil del decremento en la utilización de glucosa durante ayuno. El citrato se correlaciona positivamente con los niveles

de glucosa; pero, conserva una relación inversa con la concentración de los ácidos grasos circulantes (55, 123, 227).

En alimentación normal el incremento en la biosíntesis de ácidos grasos determina el aumento de la concentración de citrato en los tejidos incluyendo el corazón, músculo esquelético, hígado y la corteza renal (55, 123, 227). En este caso, el perfil dinámico diario del citrato y el de lactato, ambos en plasma, se correlacionan en forma cerrada. La concentración individual de citrato y la de ácidos grasos se relacionan de manera positiva (55, 123).

En dieta común o en dieta pobre en citrato, la variación circadiana normal por día del citrato, se correlaciona, en forma cerrada, con el ritmo diario del lactato pero no con los de glucosa, ácidos grasos libres o insulina. El citrato de la dieta no influye significativamente en la variación circadiana normal del mismo (123, 207). En el postabsortivo, se eleva el citrato (desde 9.0 a 30.7%) en plasma (123, 207).

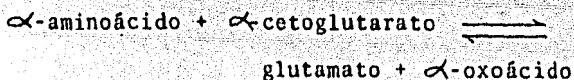
La interrelación entre los niveles plasmáticos de citrato con las variaciones circadianas de glucosa, lactato, los ácidos grasos libres o insulina, que se observan en el estado de alimentación normal o de ayuno, reflejan la importancia del citrato como regulador en el metabolismo citoplasmático (55, 123, 227).

En condiciones normales, la excreción diaria de citrato no varía, disminuye en ayuno breve y permanece consistentemente

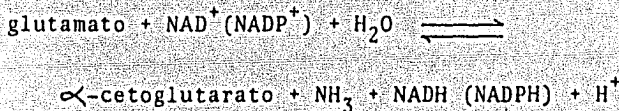
baja en ayuno prolongado. El decremento en la excreción urinaria supone un aumento en los requerimientos de citrato por el riñón, en virtud de que la gluconeogénesis está elevada. El citrato en plasma aumenta temporalmente después de nefrectomía (123, 124). En dieta pobre en citrato la excreción de éste no cambia (123, 124).

7. α -CETOGLUTARATO

El α -cetoglutarato junto con otros metabolitos -piruvato, α -cetoisocaproato, oxalacetato, α -cetoisovalerato, ácido α -ceto- β -metil-n-valérico, ácidos glioxálicos y semialdehído succínico-constituyen cetoácidos orgánicos detectados normalmente en sangre y orina (39, 103). El α -cetoglutarato representa un punto de convergencia en los procesos metabólicos de los carbohidratos, lípidos y determinados aminoácidos. Es un intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y por tanto ocupa un papel central en el metabolismo energético (96, 103, 192). El α -cetoglutarato, el glutamato y la glutamina constituyen el eje del metabolismo celular del nitrógeno y representan sitios de intersección de las vías metabólicas de los carbohidratos y del nitrógeno (66, 69, 142). El α -cetoglutarato es un sustrato clave en la función anfibólica del ciclo de Krebs -actúa en el catabolismo y en la generación de precursores para las vías anabólicas-. Es el aceptor de grupos α -amino transferidos desde el catabolismo de por lo menos 12 aminoácidos (alanina, arginina, aspartato, asparagina, cisteína, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, triptofano, tirosina y valina) transformándose en glutamato (41, 66, 96, 177, 192). La transaminación es catalizada por la α -aminoácido 2-oxoglutarato aminotransferasa específica; el piridoxal 5'-fosfato es la coenzima o grupo prostético de la enzima (41, 96, 118, 180).



Algunos aminoácidos -arginina, histidina, glutamina, glutamato y prolina- convergen su secuencia metabólica incorporándose al ciclo de Krebs, como residuos de α -cetoglutarato, vía glutamato (41, 96, 142, 192). El α -cetoglutarato deriva de glutamato a través de dos mecanismos alternativos: a) por transaminación (vía α -aminoácido 2-oxoglutarato aminotransferasa específica, alanina y aspartato aminotransferasas); b) por desaminación oxidativa (vía glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD(P)^+ , mecanismo que produce el primer grupo-amino, en forma de amoniaco libre, que entra al ciclo de la urea (87, 164, 165, 177); NAD es el aceptor electrónico preferencial.

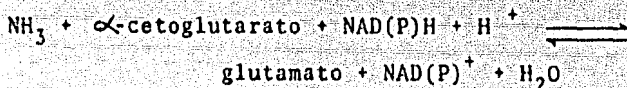


Todos los aminoácidos que por su metabolismo puedan producir glutamato, son también precursores en potencia del α -cetoglutarato (ornitina, prolina, glutamina, histidina) (96, 118, 142, -192).

Los niveles de α -cetoglutarato están controlados por reacciones de aminotransferasas que originan glutamato. El flujo de α -cetoglutarato ya sea en el metabolismo de carbohidratos (vía ciclo de los ácidos tricarbóxicos) o bien en el metabolismo del nitrógeno (vía glutamato deshidrogenasa) parece estar regulado -- por la velocidad de amidación del mismo (66, 142, 184). Para -- mantener la homeostasis del ciclo de Krebs, debe existir la con-

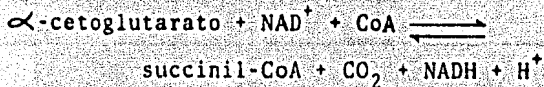
versión de glutamato a α -cetoglutarato y la producción neta de NH_3 . Alteraciones en la actividad de glutamato deshidrogenasa afectan la gluconeogénesis y la síntesis de proteínas. Si el cociente redox $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ disminuye, la vía glutamato deshidrogenasa se desplaza hacia la formación de amoníaco y α -cetoglutarato; el amoníaco se elevará en sangre y el α -cetoglutarato aumentará en orina (69, 155, 165). La toxicidad del amoníaco se debe a su facultad de separar eficazmente, vía aminación reductora por glutamato deshidrogenasa, al α -cetoglutarato del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; pudiendo provocar una fuerte inhibición de la respiración cerebral, así como un exceso en la producción de cuerpos cetónicos, a partir de acetil-CoA, en mitocondria hepática (96).

La aminación reductora del α -cetoglutarato es la vía principal de biosíntesis de glutamato. Esta es la ruta predominante de la formación de grupos α -amino, directamente a partir del amoníaco; en consecuencia, es de importancia fundamental en la biosíntesis de todos los aminoácidos (el grupo α -amino del glutamato es transferido a los α -oxoácidos produciendo el aminoácido correspondiente). Constituye un mecanismo para recuperar y reutilizar el amoníaco que deriva del catabolismo de los aminoácidos (96, 103, 118, 142, 192).



La conversión de α -cetoglutarato a succinil-CoA, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, es catalizada por el complejo

α -cetoglutarato deshidrogenasa. Este es similar al complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC), ambos requieren Mg^{2+} y utilizan cinco cofactores: pirofosfato de tiamina (TPP), ácido lipoico -- (ácido di-dioctanoico), coenzima A (CoA), flavina adenina dinucleótido (FAD) y NAD^+ (19, 30, 68, 142). Cada uno de estos complejos está constituido por tres enzimas que catalizan una secuencia ordenada e interrelacionada de reacciones. Una de las enzimas, la dihidrolipoil deshidrogenasa (más comunmente referida como lipoamida deshidrogenasa) es un componente similar en los complejos PDHC, α -cetoglutarato deshidrogenasa y en la deshidrogenasa de los cetoácidos de cadena ramificada (19, 30, 43, 68). Es factible que una mutación de la enzima dihidrolipoil deshidrogenasa, afecte la actividad de los sistemas enzimáticos PDHC y α -cetoglutarato deshidrogenasa, a la vez (19, 43, 68). En este desorden metabólico aumentan, en forma marcada, la excreción urinaria de α -cetoglutarato y los niveles plasmáticos de glutamato y prolina (43,68). La oxidación de α -cetoglutarato a succinil CoA es una reacción biológicamente irreversible (96, 118, 192).



El ciclo de los ácidos tricarboxílicos exhibe, al menos, dos flujos metabólicos y en él pueden operar dos sistemas generadores de flujo. Estos últimos son reacciones de no equilibrio, catalizadas por citrato sintasa (CS) y α -cetoglutarato deshidrogenasa, cuyos K_m son considerablemente menores que la concentra-

ción del sustrato-vía (acetil-CoA y α -cetoglutarato, respectivamente) in vivo. El sustrato-vía está definido como el sustrato - que representa el flujo de materia a través de la vía metabólica adecuada. Las vías generadoras de flujo, CS y α -cetoglutarato - deshidrogenasa, son necesarias para regular la incorporación de - los residuos metabólicos que entran al ciclo de Krebs, ya sea como acetil-CoA o bien como α -cetoglutarato (proveniente de glutamato) (66, 142, 227, 229).

La oxidación acelerada de piruvato induce un incremento, - en la concentración molar, de los pares reguladores intramitocondriales incluyendo, acetil-CoA/CoA, ATP/ADP y NADH/NAD⁺, los cuales influyen en la actividad de CS y de α -cetoglutarato deshidrogenasa. La concentración aumentada de acetil-CoA controla el flujo a través de CS, aunque ocurra disminución de oxalacetato, en virtud de que el cociente intramitocondrial NADH/NAD⁺ se eleva. La relación aumentada ATP/ADP se correlaciona con un aumento de - la concentración de succinil-CoA mitocondrial. Se ha confirmado que la CS es inhibida cuando succinil-CoA se eleva y el acetil-CoA permanece relativamente bajo. Succinil-CoA es un inhibidor competitivo con respecto a acetil-CoA y es no competitivo con respecto a oxalacetato. La constante inhibitoria (K_i) para succinil-CoA es alta ($130 \mu\text{M}$) comparada con el K_m para acetil-CoA ($8 \mu\text{M}$). Así, un incremento importante de acetil-CoA es requerido para producir un aumento mínimo de flujo CS, esto se debe a dos factores; a) el succinil-CoA se eleva, en forma simultánea, conforme aumenta el acetil-CoA; y b) el acetil-CoA está cerca de la zona K_m sensible

para la regulación del flujo a través de la enzima. El aumento de succinil-CoA y del equilibrio redox NADH/NAD^+ intramitocondriales, probablemente dan cuenta de la inhibición de α -cetoglutarato deshidrogenasa cuando el flujo CS está aumentado. La inhibición por succinil-CoA es competitiva con respecto a CoA ($K_i \approx 10 \mu\text{M}$). El NADH es también un fuerte inhibidor (K_i de $4.5 \mu\text{M}$), pero es no competitivo con respecto a α -cetoglutarato y a NAD. El flujo a través de α -cetoglutarato deshidrogenasa aumenta cuando la competencia por oxalacetato entre CS y aspartato aminotransferasa es favorable a esta última, vía por la cual se incrementa la producción de α -cetoglutarato. En consecuencia, la inhibición de α -cetoglutarato deshidrogenasa, por succinil-CoA y NADH, puede superarse en virtud de la concentración elevada de α -cetoglutarato intramitocondrial (152).

En condiciones de transición metabólica, el ciclo de los ácidos tricarbónicos está determinado por factores de control cinético que operan a nivel de las propias enzimas del ciclo y en los sistemas de acarreadores de intercambio aniónico. Estas interacciones inducen cambios en la concentración gradiente de los intermediarios del ciclo, a través de la membrana mitocondrial, para activar una nueva condición de flujo en el estado metabólico actual. Así, por ejemplo, durante la transición a un estado metabólico glucolítico, aumenta la producción de NADH (en el paso de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) lo cual causa un rápido aumento del flujo malato deshidrogenasa citosólico. El transporte de equivalentes reductores (NADH) a mitocondria, para oxidación

vía cadena respiratoria, procede vía ciclo malato-aspartato. Este involucra la entrada de malato y glutamato y la salida de aspartato y α -cetoglutarato desde mitocondria. El ciclo malato-aspartato se acopla a pasos de transaminación y deshidrogenación por las isoenzimas, cinética e inmunológicamente diferentes en los espacios citosólico y mitocondrial, aspartato aminotransferasa y malato deshidrogenasa. El mismo sistema de transporte aniónico que opera en el ciclo malato-aspartato, también participa en la síntesis neta de intermediarios del ciclo de Krebs (36, 95, 132, 152, 192).

El suministro de oxalacetato, como oxidante para el NADH - vía malato deshidrogenasa citosólica, depende del flujo incrementado aspartato aminotransferasa citosólico, lo cual causa un rápido decremento de aspartato y aumento de glutamato, ambos en el citosol. El malato citosólico es traslocado (tan rápido como se forma) a la mitocondria por un intercambio estequiométrico con el α -cetoglutarato mitocondrial. El flujo del malato es mantenido por su reoxidación a oxalacetato, vía malato deshidrogenasa mitocondrial, y su conversión a citrato y a α -cetoglutarato. El α -cetoglutarato mitocondrial, provee α -cetoglutarato citosólico como aceptor de grupos amino, los cuales son cedidos por el aspartato en la vía aspartato aminotransferasa. El aspartato mitocondrial se trasloca en intercambio por glutamato + H^+ citosólicos, intercambio electrogénico que causa una relativa oxidación del citoplasma respecto a la mitocondria. El aumento del intercambio glutamato-aspartato, se asocia con una rápida depleción -

del aspartato citosólico. El aumento del flujo a través de aspartato aminotransferasa mitocondrial, a partir de glutamato, regenera al aspartato mitocondrial. La elevada velocidad del flujo de glutamato a la mitocondria influye, en forma decisiva, en los cambios de flujo del ciclo de los ácidos tricarbóxicos; causa competencia por oxalacetato entre la citrato sintasa y la aspartato aminotransferasa, promoviendo el flujo hacia esta última vía, lo cual regenera al α -cetoglutarato mitocondrial. Los cambios en la concentración mitocondrial de glutamato y de α -cetoglutarato, los cuales regulan el flujo de estos sustratos a las vías aspartato aminotransferasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa, respectivamente, son compensados por el incremento de malato mitocondrial. El malato mitocondrial provee oxalacetato accesible y contrarresta la concentración gradiente que el α -cetoglutarato tiene respecto al malato citosólico; si esto no ocurriera, aumentaría la velocidad de intercambio α -cetoglutarato-malato (36, 95, 138, -- 152, 210).

El α -cetoglutarato es transaminado con los aminoácidos de cadena ramificada (valina e isoleucina), vía la aminotransferasa específica de los aminoácidos ramificados, para formar glutamato y los α -oxoácidos respectivos. Los α -oxoácidos se incorporan, vía la formación de propionil-CoA, como intermediarios (malato) del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (2, 34, 41, 44, 46, 52). La actividad de las deshidrogenasas de los α -oxoácidos es predominante en mitocondrias hepática y renal (41, 44). La transaminación de los aminoácidos de cadena ramificada, su oxidación parcial

y la liberación sistémica de los α -oxoácidos derivados, ocurren en forma sustancial en el músculo (34, 41, 44, 52, 95).

Los niveles de α -cetoglutarato en fluido cerebroespinal y en plasma conservan una relación proporcional entre sí. Los dos presentan una tendencia marcada a disminuir, siguiendo un patrón comparable, conforme aumenta la edad. La concentración de α -cetoglutarato en fluido cerebroespinal de un adulto es significativamente menor que en un niño (76). El α -cetoglutarato se eleva en sangre después de comer. La excreción urinaria de α -cetoglutarato varía con la velocidad de su producción. Adultos sanos en reposo excretan normalmente 5-20 $\mu\text{g}/\text{min}$ (39, 103). En acidemia láctica crónica, debida a deficiencia de PC, aumenta la eliminación de malato, fumarato y de α -cetoglutarato; ya que estos metabolitos no se elevan en sangre, el mecanismo de excreción urinaria puede reflejar ya sea un aumento en su producción renal, o bien una disminución de su reabsorción tubular (61, 77, 103). Los valores de α -cetoglutarato en fluido cerebroespinal de niños con diagnóstico de ataques febriles o de epilepsia, no difieren (en forma importante) de los niveles observados en niños normales (76). Evidencias experimentales sugieren que el piruvato y el α -cetoglutarato se incrementan significativamente en cerebro de ratas hiperventiladas para reducir la tensión arterial de CO_2 e incrementar el pH en plasma (76, 102).

8. GLUTAMATO

El glutamato ocupa una posición central en el metabolismo intermedio de todos los tejidos. El glutamato tiene un papel crítico en el sistema nervioso, se ha postulado que funcione posiblemente como neurotransmisor excitatorio (66, 80, 142, 184, 186). Se encuentra en niveles excepcionalmente elevados en este tejido (10-12 μ mol/g de tejido) (157, 184, 185). En el tejido cerebral la poza de aminoácidos libres es superior con respecto a la de la mayoría de los tejidos y se caracteriza por la preponderancia del glutamato (7.1 μ mol/g de tejido) (66, 142, 184). El glutamato junto con el aspartato, el ácido N-acetilaspártico, la glutamina, el glutatió*n* y el ácido γ -aminobutírico (GABA), cuantifican con el 80% aproximadamente del contenido de nitrógeno amínico no proteínico del cerebro (142, 192). La poza metabólicamente activa de glutamato en el tejido cerebral representa, aproximadamente, menos que el 20% de la concentración cerebral total (66, 184, 185). Se ha evidenciado que una pequeña poza subcelular de glutamato puede estar involucrada en neurotransmisión (66, 142, 184, 185). Los niveles intracelulares de glutamato en el tejido cerebral son muy elevados (80, 142, 226).

La poza extracelular de glutamato en los tejidos periféricos es pequeña (142, 226). El glutamato es el producto final de la mayoría de las transaminaciones en el compartimiento citosólico. Procede de la aminación del α -cetoglutarato, vía aminotransferasas específicas, siendo el aceptor final del nitrógeno libe-

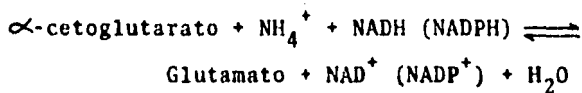
rado en el catabolismo de los aminoácidos--alanina, arginina, aspartato, asparagina, cisteína, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, triptofano, tirosina y valina-- (41, 66, 96, 177). El glutamato es el donador primario de grupos amino para la biosíntesis de aminoácidos (96, 118, 177). La desaminación oxidativa -- del glutamato, en mitocondria hepática, produce el primer grupo amino (en forma de amoniaco libre) que entra al ciclo de la urea (87, 164, 165, 177). El glutamato participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, se incorpora a éste como α -cetoglutarato vía glutamato deshidrogenasa o vía aminotransferasa específica -- (96, 118, 170).

En estudios del metabolismo de glutamato en homogenados y tejidos de corteza cerebral (de rata y cobayo) proveen fuerte evidencia de que el glutamato es un sustrato altamente activo, fuente potencial de carbono y energía a través de oxidación aeróbica (66, 142, 184). La cuantificación experimental de la incorporación metabólica de $[1-^{14}\text{C}]$ y $[5-^{14}\text{C}]$ -glutamato y de los intercambios isotópicos ocurridos mostró los siguientes resultados. La oxidación de glutamato dió cuenta del 35% del oxígeno total consumido. La producción de CO_2 representó el 80-90% del glutamato total removido. El γ -aminobutirato formado derivó de casi el 10% del glutamato total removido. El glutamato se transformó cuantitativamente en aspartato como paso inicial de su catabolismo (66). En presencia de glucosa o de piruvato se inhibía la movilización del glutamato en un 26 y 61%, respectivamente. Casi un 10% del glutamato isotópico no fue cuantificable, sugiriéndose la posibilidad de que el glutamato hubiera experimentado desaminación oxi-

dativa produciendo α -cetoglutarato y amonio. Se detectó una pequeña fracción de aspartato (14; aproximadamente) que derivaba de γ -descarboxilación (66).

El metabolismo oxidativo del glutamato procede via ciclo de los ácidos tricarbóxicos y reacciones colaterales de aminotransferación (66, 142, 184). Se ha postulado que el glutamato participe directamente en un ciclo de los ácidos tricarbóxicos modificado, en el cual las reacciones entre α -cetoglutarato y succinato son reemplazadas por la vía γ -aminobutirato (constituida -- por la secuencia metabólica: glutamato \rightarrow γ -aminobutirato \rightarrow semi aldehído succínico \rightarrow succinato) (66).

La vía primordial de biosíntesis del glutamato es la aminación reductiva del α -cetoglutarato por la enzima alostérica glutamato deshidrogenasa (GLDH) (96, 118, 142, 177). La (GLDH) es -- inhibida por ATP, GTP, y NADH; es estimulada por ADP, GDP y ciertos aminoácidos. La actividad de la GLDH es estimulada por la -- hormona tiroidea (tiroxina) y ciertas hormonas esteroides (96, - 118, 192). La reversibilidad de esta reacción provee un mecanis-



mo para modular el flujo del α -cetoglutarato ya sea al metabolis-- mo de carbohidratos (vía ciclo de los ácidos tricarbóxicos) o -- bien al metabolismo del nitrógeno (vía glutamato deshidrogenasa) (142, 177).

El α -cetoglutarato (α -oxoácido) es transaminado (el grupo α -amino de un aminoácido es transferido al α -carbono del α -oxoácido) para dar glutamato, reacción catalizada por la enzima L-aminoácido 2-oxoglutarato aminotransferasa específica dependiente de piridoxal 5'-fosfato (como grupo prostético) (41, 96, 118, 180).

La glutaminasa, enzima casi exclusivamente mitocondrial y de importancia crítica en la función renal; hidroliza a la glutamina produciendo glutamato y amoníaco libre (41, 177, 226).

El sustrato precursor Δ 'pirrolina 5-carboxilato (derivado de prolina) después de su deshidrogenación vía enzima Δ 'pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa, experimenta la apertura del anillo formando el γ -semialdehído del ácido glutámico; este último se oxida a glutamato (96, 142, 180, 190). El glutamato se sintetiza también a partir del catabolismo de la histidina, de arginina y de la hidroxiprolina (96, 142, 180, 192). El glutamato puede derivar de intermediarios del metabolismo de glucosa, vía glucólisis, conversión a piruvato, oxidación a acetyl-CoA, ciclo de los ácidos tricarbónicos y la actividad de las aminotransferasas como reacciones colaterales anabólicas (44, 66, 96).

El metabolismo oxidativo del glutamato está ampliamente distribuido en el hígado, el músculo esquelético, el corazón, el cerebro, el riñón y el intestino (66, 177, 180). La etapa inicial del metabolismo del glutamato es la eliminación del grupo α -ami-

no vía dos mecanismos alternativos: a) por transaminación, vía L-aminoácido 2-oxoglutarato aminotransferasa específica, produce α -cetoglutarato; y b) por desaminación oxidativa, vía glutamato deshidrogenasa, formando α -cetoglutarato y amoniaco libre -- (41, 44, 96, 192). La transaminación suministra un medio para la síntesis de otros aminoácidos y facilita la redistribución de nitrógeno (177, 192). La elevada actividad de las enzimas aminotransferasas del tejido hepático, potencialmente en relación a las de otros tejidos, es de relevancia en la función gluconeogénica y ureogénica hepáticas (41, 164, 170, 188). En condiciones de inanición prolongada, en diabetes aguda y en ejercicio muscular extenuante, aumenta la movilización de los aminoácidos glutamato, prolina, arginina, ornitina e histidina (desde músculo esquelético) estimulando posiblemente la velocidad de gluconeogénesis hepática y renal, vía α -cetoglutarato \rightarrow a citrato \rightarrow a oxalacetato; sin embargo, en estos estados metabólicos los niveles circulantes del glutamato pueden no cambiar (34, 104, 152, 184). En la fase postabsortiva ocurre una pequeña asimilación de glutamato desde el tejido periférico al músculo esquelético (41, 44, 104). La poza intrahepática de glutamato deriva de tres fuentes: a) de proteólisis; b) de transaminación intracelular (inclusive intramitocondrial) -a partir de alanina, aspartato, tirosina, fenilalanina, lisina y ornitina-; y c) del catabolismo de otros aminoácidos -histidina, prolina y arginina- (41, 96, 142, 170, 177, 190). En condiciones fisiológicas la velocidad de eliminación de NADH, NH_3 y α -cetoglutarato, vía GLDH, opera con suficiente rapidez como para suministrar el amoniaco libre requerido

para la síntesis de urea en el tejido hepático (41, 164, 170).

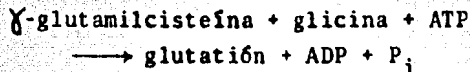
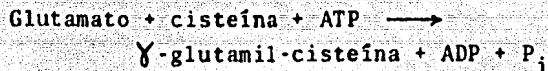
En el tejido cerebral sólo una pequeña porción del contenido intracelular de glutamato deriva de la circulación sanguínea (66, 142). El glutamato y el aspartato tienen permeabilidad restringida en las membranas mitocondriales cerebral y hepática (19, 41, 78, 192). El glutamato, el aspartato y el γ -aminobutirato salen del cerebro muy efectivamente (19, 78, 142, 192). En el cerebro, la poza metabólicamente activa de glutamato se sintetiza de novo (66, 157, 186). In vivo, la oxidación de la glucosa en corteza cerebral previene la utilización (vía oxidación) del glutamato o causa que éste sea resintetizado tan rápidamente como se cataboliza (66, 157, 184). En la corteza cerebral el glutamato es un metabolito altamente activo, puede convertirse en una variedad de compuestos incluyendo el α -cetoglutarato, la glutamina, el ácido γ -aminobutírico (GABA), el piroglutamato, los α -glutamilpéptidos y los γ -glutamilpéptidos (el glutatión) (66, 80, 142, 184). El glutamato y sus metabolitos desempeñan una función dual, como intermediarios en las vías cruciales del metabolismo cerebral y como neurotransmisores modulando los impulsos eléctricos (80, 142, 184). Los desordenes del metabolismo del glutamato se asocian con alteraciones profundas del sistema nervioso central. Los mecanismos bioquímicos responsables en estos desordenes se desconocen (80, 142, 184, 185).

La descarboxilación del glutamato, vía glutamato descarboxilasa y el cofactor fosfato de piridoxal, produce ácido γ -ami

noburítico (GABA) (66, 142, 147). GABA está presente en niveles elevados ($0.59 \mu\text{mol/g}$ de tejido) en el cerebro; niveles $<0.02 \mu\text{M}$ ocurren en plasma y en fluido cerebroespinal (142, 147, 192).

El papel de GABA como neurotransmisor inhibitorio se ha establecido razonablemente por estudios que describen: a) la distribución no uniforme de GABA en el sistema nervioso central (SNC) -- desde áreas específicas del cerebro; b) la elevada afinidad de enlace de GABA a preparaciones enriquecidas por terminales sinápticas; c) la liberación de GABA dependiente de Ca^{2+} , desde sinaptosomas, por las terminales sinápticas; d) la hiperpolarización de neuronas expuestas a GABA y antagonizadas por picrotoxina y bicuculina; y e) el receptor benzodiazepina interacciona con el receptor de GABA aumentando el efecto inhibitorio de GABA (41, 142, 147, 185). La deficiencia en piridoxina y la administración de hidrazida isonicotínica, con un descenso en el nivel de la actividad de la descarboxilasa glutámica del cerebro, da lugar a una alteración convulsiva que se reprime por la administración de GABA (96). Una baja afinidad de la glutamato descarboxilasa por el fosfato de piridoxal causa convulsiones; este desorden -- responde a terapias con dosis elevadas de B_6 (142). GABA se degrada a succinato en una secuencia de dos reacciones. La primera es la transaminación de GABA (el grupo α -amino de GABA se -- transfiere al α -cetoglutarato) produciendo semialdehído succínico. La otra, es la reducción de semialdehído succínico a ácido γ -hidroxibutírico. La oxidación del aldehído, reacción NAD^+ -dependiente, forma succinato (142, 147, 192). El tejido cerebral sintetiza γ -guanodobutírico y homocarnosina a partir de GABA (142, 147, 192).

El glutatión es el γ -glutamilpéptido natural más abundante (96, 115, 142, 190). Es un tripéptido simple presente virtualmente, en niveles sustanciales, en todas las células de los mamíferos (115, 190). Su síntesis intracelular a partir de glutamato, cisteína y glicina es catalizada por la acción combinada de la γ -glutamilcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa (115, 142, 190).



Se sintetiza en forma reducida (GSH) y por vías que involucran transhidrogenación y glutatión peroxidasa se convierte a la forma oxidada (GSS). La reducción de GSS a GSH ocurre vía glutatión reductasa (flavoproteína NADPH-dependiente) (115, 142, 190). El glutatión funciona en procesos que incluyen la reducción de -- compuestos clave, la protección de membranas celulares y de otros componentes celulares y como componente de sistemas de transporte (41, 115, 142, 190).

En dietas elevadas en carbohidratos, en obesidad y en comida proteínica, los niveles de glutamato en plasma no varían. En ayuno breve, en cetosis diabética y en pacientes nefrectomizados, el glutamato disminuye en forma importante. En ayuno prolongado el glutamato declina más del 50%. En glucagonoma ocurre un aumento crítico de glutamato en plasma (33, 70).

9. GLUTAMINA

La glutamina es el aminoácido más abundante en el compartimiento extracelular. La poza de glutamina es del mismo orden -- que la poza de glucosa (118, 142, 226). La glutamina conforma -- el 20% del contenido total de los aminoácidos plasmáticos (66, 118, 144). La glutamina conjuntamente con los aminoácidos glutamato, aspartato y alanina constituyen la fracción predominante de los -- aminoácidos totales como componentes celulares (192, 226). La -- glutamina, el glutamato y el aspartato son el centro del metabo- lismo celular del nitrógeno. Representan vías de cruce donde -- interceptan las vías metabólicas de los carbohidratos y del nitró- geno (66, 69, 142, 184). Virtualmente en todas las células la -- glutamina y el glutamato son la fuente de nitrógeno primaria re- querida para la biosíntesis de compuestos nitrogenados (96, 118, 142, 177, 192). La glutamina es transportada a través de las -- membranas celulares en forma muy efectiva (41, 118, 226). Des- pués de administración I.V. de glutamina y otros aminoácidos (me- tionina, glicina, arginina, tirosina) estos aparecen rápidamente en el cerebro (192). La glutamina cruza libremente la barrera -- hemato-encefálica (226). Una elevada cantidad de glutamina se -- transfiere a través de la membrana placentaria. La placenta cap- ta glutamato desde la circulación fetal para su conversión a glu- tamina (228, 229). Se ha postulado que la glutamina puede con- tribuir directamente como donador de nitrógeno a la síntesis de -- urea (165, 177, 190, 226).

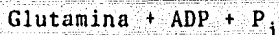
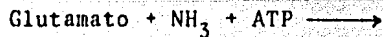
Los estudios metabólicos en cultivos de células de carcinoma humano, HeLa, son fuerte evidencia de que la glutamina, más que las hexosas (glucosa, fructosa, galactosa), es la fuente potencial de carbono y energía fundamental para el crecimiento celular in vitro (144).

La glutamina aportó el 65% de los requerimientos energéticos celulares cuando una concentración elevada de glucosa (10mM) se incluía en el medio de cultivo. La glutamina suministraba más del 98% de energía si la fructosa o galactosa eran las hexosas presentes (2mM) (144). En este último caso la oxidación de $^{14}\text{U-C}$ glutamina fue cuantificable en un 90%. La glutamina se incorporó a diversas vías metabólicas incluyendo casi un 35% -- que se oxidó hasta CO_2 vía ciclo de los ácidos tricarboxílicos; aproximadamente un 13% produjo lactato; un 18-25% se integró en macromoléculas; un 15% se incorporó a pozas de aminoácidos y compuestos de pirimidina, en derivados de aspartato y en productos de degradación; y una fracción menor del 2% se integró directamente en proteínas (144, 171). Se ha postulado que la función primaria de las hexosas (glucosa, fructosa, galactosa) posiblemente sea la de proveer carbono para la biosíntesis de ácidos -- nucleicos y de aminoácidos no esenciales (66, 144, 171, 214). La oxidación de la glutamina es varias veces más eficiente en la producción de ATP que la oxidación de glucosa a lactato (144, -- 214).

Otras observaciones también soportan que la glutamina es

el sustrato energético principal en diversos tejidos y células. Su oxidación es preferida por los eritrocitos, las células de linfoma y por fibroblastos de hamster chino (144, 171, 214). Es esencial para la supervivencia de las células de linfoma en cultivo (144, 171). La glutamina se absorbe ampliamente en el intestino y su metabolismo produce CO_2 que da cuenta del 57% aproximadamente de la glutamina incorporada a través de esta vía; un 6% se integra en citrulina; un 5% produce prolina y casi un 18% origina ácidos orgánicos (144, 171, 214). La utilización de glutamina por fibroblastos diploides humanos en división se incrementa en medios ausentes de glucosa suplementados con purinas y pirimidinas (144, 171, 214).

La biosíntesis de glutamina es de importancia fisiológica para la captación de amoníaco en tejido nervioso (mecanismo fundamental de eliminación de esta molécula extraordinariamente neurotóxica) y en otros tejidos (164, 177, 184, 186). La glutamina se sintetiza por la adición de amoníaco a la molécula de glutamato, vía glutamina sintetasa, formándose el enlace amídico en el grupo γ -carboxilo del glutamato (142, 177, 184, 226). La reacción es irreversible y representa la única vía de síntesis de



glutamina en los tejidos de mamíferos (80, 185, 226). La cuantía y velocidad de ésta excede a otros mecanismos de fijación de amoníaco en los mamíferos (142, 165, 226). La actividad de la glu-

tamina sintetasa es baja en el músculo. Sin embargo, el músculo libera cantidades importantes de glutamina en virtud de la gran área que ocupa el tejido muscular (41, 70, 82). En hígado una fracción considerable de la enzima está inactiva (41). En tejido cerebral la glutamina sintetasa está ampliamente distribuida en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias (80, 185, 186).

La eliminación hidrolítica del grupo γ -amídico de la glutamina por la enzima glutaminasa produce glutamato. Es una reacción irreversible (96, 142, 185, 226). La glutaminasa renal es de suma importancia fisiológica en la síntesis de iones NH_4^+ como



mecanismo que promueve la conservación de cationes y restituye el pH extracelular normal durante acidosis metabólica (41, 45, 96, 133). Los destinos metabólicos del nitrógeno γ -amídico de la glutamina incluyen las vías de biosíntesis de hexosaminas (glucosamina-6-fosfato), de nucleótidos (GTP, GMP, AMP), de aminoácidos (ej. triptofano, histidina, asparagina, arginina) y la síntesis de otros compuestos claves (carbamilfosfato, purinas y pirimidinas) (120, 142, 177, 192, 226). El carbamilfosfato es importante para la carbamilación de grupos amino en la síntesis de pirimidinas y en la formación de citrulina. El equilibrio irreversible catalizado por la enzima carbamilfosfato sintetasa mitocondrial requiere de N-acetilglutamato (cofactor alostérico) y de ATP (2 molas). La enzima carbamilfosfato citoplasmática importante en el ciclo de la urea no requiere de N-acetilglutamato

(142, 164, 165, 170).

El nitrógeno α -amino de la glutamina se transfiere, vía glutamina transaminasa, al α -cetoglutarato para formar glutamato y α -oxoglutaramato (142, 192, 226). La función de este último en el metabolismo intermedio no ha sido aclarada (142). El α -oxoglutaramato parece existir, en forma predominante, como un anillo lactámico (2-hidroxi-5-oxoprolina) en equilibrio con una molécula de cadena abierta; ésta puede experimentar desaminación por la enzima ω -amidasa formando α -cetoglutarato y amoníaco (142, 192, 226). Los niveles normales de α -oxoglutaramato en fluido cerebroespinal humano equivalen a $6.0 \mu\text{M}$ (142).

La glutamina plasmática deriva fundamentalmente de músculo esquelético y contribuyen en menor proporción el hígado, el riñón y el cerebro (41, 52, 70, 82, 118). La poza intracelular de aminoácidos libres es la precursora de la síntesis de novo de alanina y glutamina en el músculo esquelético (41, 52, 82, 118). Se presume que esta poza es repletada por la degradación de proteína muscular (41, 52, 82). La proteólisis muscular libera alanina y glutamina en cantidad no mayor del 8% del total de residuos que integran la proteína muscular (41, 45, 52, 82). La glutamina deriva además del catabolismo de otros aminoácidos y de la oxidación de glucosa (45, 46, 52). Por lo tanto, la movilización de glutamina desde el músculo esquelético es desproporcional con respecto a la cantidad de glutamina constitutiva de proteína muscular (11, 41, 46, 52, 82). La velocidad de proteólisis, el con-

trol del catabolismo de los aminoácidos precursores, la dinámica del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la regulación de los flujos anaplerótico y de liberación de intermediarios del ciclo de Krebs, son controles que influyen en la síntesis y en la excreción de alanina y glutamina desde el músculo esquelético (11, 52, 53, 82).

En estado fisiológico basal la alanina y la glutamina representan las 2/3 partes del total de residuos de aminoácidos -- que moviliza el músculo (41, 52, 104, 146, 154). En el postabsortivo (12-14 horas de ayuno) su liberación da cuenta de más -- del 50% del nitrógeno total α -amino excretado. La extracción fraccional esplánica de alanina y glutamina excede a la de todos los residuos liberados y contribuye al balance negativo de aminoácidos en músculo (41, 52, 146, 154). La entrada de glutamina al tejido esplánico (ej. hígado, tracto gastrointestinal superior, bazo, páncreas) es cuantitativamente comparable a la captación de alanina por el mismo (44, 47, 54, 133, 154).

En ayuno breve (5-10 días) aumenta la síntesis y la liberación de alanina y glutamina (44, 69, 133, 154). Ambos sustratos son precursores primarios de gluconeogénesis hepática y renal, respectivamente (44, 52, 69, 82, 133). En ayuno prolongado -- (3-4 semanas), en diabetes mellitus (cetósica y no cetósica) y en condiciones que eleven los niveles de cortisol o de tirosina, -- ocurre una reducción drástica de la velocidad de excreción de -- glutamina desde el músculo esquelético (44, 52, 53, 154). La -

dieta y factores hormonales influyen de manera cuantitativa en la movilización de alanina y glutamina desde el músculo esquelético (44, 52, 82, 133). En la evolución de un proceso infeccioso, la glutamina libre de las células musculares disminuye casi en un 50% (3, 11, 31, 130).

El intestino es cuantitativamente más importante que el riñón en la captación de glutamina (144, 154, 171, 214). Es el sitio, por excelencia, de depuración de glutamina la cual provee el nitrógeno requerido para la síntesis de cantidades sustanciales de alanina que este tejido libera a la circulación periférica (41, 44, 45, 146). La glutamina que el intestino extrae de sangre arterial y de lumen intestinal constituye un importante soporte energético para este tejido en condiciones de inanición (41).

El riñón presenta una entrada neta de glutamina, prolina y glicina (41, 45, 142, 154). En corteza renal la glutamina se sintetiza a partir de glutamato, de prolina, de hidroxiprolina y de alanina (41, 45, 50, 142, 190). Posiblemente la velocidad de extracción de glutamina por riñón sea el paso limitante de la velocidad de gluconeogénesis renal a partir de este sustrato (41, 44, 52, 70). La glutamina tiene importancia fisiológica en el balance neto de nitrógeno y en la excreción renal de iones NH_4^+ (52, 70, 95, 142). En acidosis metabólica persistente la amonificación renal es cuantitativamente más significativa que la acidificación de la orina (70, 87, 142, 192). La actividad de la enzima glutaminasa renal es relevante en la producción de iones --

NH_4^+ (41, 45, 133, 165). La acumulación intramitocondrial de -- glutamato, producto de la hidrólisis de glutamina, provoca la - - caída de pH. El amoníaco formado se trasloca rápidamente, junto con H^+ , fuera de la mitocondria y en intercambio con K^+ citosóli co. El K^+ estimula la actividad de la glutaminasa (41). En -- inanición prolongada la producción renal de NH_4^+ da cuenta aproxi madamente del 42% del total de nitrógeno excretado (44, 133, 154). En este caso la actividad gluconeogénica renal suministra casi el 50% de la producción global de glucosa sistémica (44, 45, 133, -- 154).

La extracción fraccional de glutamina en hígado es mínima (44). Estudios in vitro de incorporación de glutamina marcada en gluconeogénesis indican que esta vía representa 1/10 de la ca pacidad que tiene la alanina para la síntesis de glucosa (44, - - 133). En hígado la glutamina se forma de la poza pre-existente de glutamato (66, 184, 185).

La glutamina cerebral deriva de una pequeña poza da gluta- mato sintetizado de novo (157, 184, 185). El glutamato proviene de la aminación reductiva del α -cetoglutarato, vía glutamato - - deshidrogenasa, en el compartimiento mitocondrial (105, 127, 138, 185). La poza de α -cetoglutarato es repletada por el potente - mecanismo de fijación de CO_2 a los aminoácidos precursores de in- termediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que presenta el cerebro (66). La síntesis de glutamina cerebral aumenta cuan do los niveles de amoníaco se elevan en sangre (192, 226). En -

hiperamonemia el aumento en la poza intracerebral de glutamina induce un rápido intercambio de glutamina por aminoácidos neutros plasmáticos. Se ha reportado que la hiperamonemia contribuye, en forma indirecta, con la encefalopatía en virtud de que la elevada concentración de los aminoácidos neutros alterará el metabolismo de sustratos neurotransmisores (41, 142, 165). Las deficiencias enzimáticas en carbamilfosfato sintetasa, en ornitina transcarbamilasa, en arginina succinato sintetasa y en arginina succinasa, son alteraciones metabólicas que causan hiperamonemia (87, 142, 155, 164, 190), se asocian con disturbios neurológicos (convulsiones), letargia, vómito y coma (142, 155, 170, 190). Se ha postulado que la concentración elevada de NH_4^+ afecta las propiedades eléctricas de las neuronas, incrementando su excitabilidad y actividad lo cual conduce a un proceso convulsivo (41, 66, 142, 164). Se ha sugerido que la concentración excesiva de NH_4^+ interfiere en la biosíntesis de nucleótidos de purina y estimula la producción de nucleótidos de pirimidina de novo (41, 87, 170). Estos cambios contribuyen posiblemente al retraso mental y en el crecimiento en hiperamonemia crónica (87, 170).

El contenido de glutamina en el tejido cerebral es aproximadamente de 5-10 $\mu\text{mol/g}$ (100, 142, 184). En fluido cerebroespinal fluctúa entre 161-533 μM (142).

La dieta elevada en carbohidratos, la alimentación con proteínas, la obesidad y el ayuno breve, son condiciones que no alteran los niveles plasmáticos de glutamina. El ayuno prolon-

gado, la cetosis y acidosis diabéticas, ocurren con un decremento importante de glutamina en plasma. En nefrectomizados la glutamina se eleva (33, 44).

10. ASPARTATO

Glutamato y aspartato son aminoácidos glucogénicos, la eliminación del grupo α -amino produce los α -cetoácidos correspondientes, α -cetoglutarato y oxalacetato, que son compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (96, 118, 192). Alanina y aspartato son anticetogénicos, ambos incrementan la accesibilidad de oxalacetato y dirigen acetil-CoA a síntesis de citrato en lugar de orientarlo a cetogénesis, aunque otros mecanismos operativos pueden estar involucrados (1, 57, 109, 127). Glutamina, glutamato y aspartato, están presentes en cantidades elevadas en cerebro, se producen in situ de sus respectivos α -cetoácidos, α -cetoglutarato y oxalacetato (143, 157, 186). En hígado, el aspartato deriva de la poza de glutamato sintetizada de novo; en cerebro, el aspartato proviene de la poza de glutamato pre-existente (80, 185, 186). Glutamato y aspartato presentan una permeabilidad restringida en varios tejidos incluyendo el cerebro e hígado. Ambos se producen rápidamente en cerebro, a una velocidad total paralela a la renovación de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Estos aminoácidos, no esenciales, están involucrados en neurotransmisión y abandonan el tejido cerebral en forma muy efectiva (19, 78, 142, 159, 192). La enzima piruvato carboxilasa cataliza la reacción anaplerótica fundamental del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, suministra oxalacetato para "iniciar" el ciclo; esta vía metabólica provee el esqueleto carbonado para la biosíntesis de moléculas neurotransmisoras incluyendo glutamato, aspartato y γ -aminobutirato (GABA). Bloqueos meta

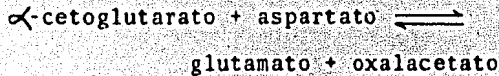
bólicos o deficiencias enzimáticas en este nivel inducen producción inadecuada de estos metabolitos neurotransmisores (19, 78, - 142, 159, 218, 235). El metabolismo intestinal de aspartato exógeno (ingesta en la dieta) y de glutamato (derivado de glutamina) provee un mecanismo de homeostasis, de importancia fisiológica, para el mantenimiento de concentraciones sistémicas mínimas, no neurotóxicas, de ambos aminoácidos (41, 44, 104). Glutamato y aspartato conforman, aproximadamente, el 20-30% de los residuos constitutivos de las proteínas incluidas en la dieta; sin embargo, la liberación de ambos por tejido gastrointestinal está ausente y en cambio se incrementa la liberación de alanina (44).

En el músculo esquelético, en condiciones fisiológicas, los aminoácidos libres de poza intracelular, incluyendo aspartato, isoleucina, leucina, valina y treonina, son precursores de la síntesis neta de novo de alanina. El carbono que deriva del metabolismo de estos aminoácidos es liberado como alanina, piruvato, o bien como lactato; este mecanismo contribuye a suplir sustratos, desde músculo, para la vía gluconeogénica hepática (44, 45, 47, - 52, 82, 95). Las reacciones involucradas en la síntesis de alanina son: a) la transaminación del aminoácido con α -cetoglutarato (aspartato, valina e isoleucina), vía la aminotransferasa específica, para formar el α -oxoácido respectivo; b) la metabolización del α -oxoácido en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos para formar malato; c) la descarboxilación oxidativa del malato, vía enzima málica-NAD(P)⁺, para producir piruvato; d) la formación de alanina, reacción que regenera, vía aminotransferación, al α -ce-

tooglutarato utilizado en la transaminación inicial (44, 45, 52, 53, 82, 95). El oxalacetato (α -oxoácido del aspartato) se reduce a malato, vía malato deshidrogenasa-NAD⁺ citosólica o mitocondrial. El metabolismo de los α -oxoácidos de cadena ramificada (valina, - isoleucina) vía propionil-CoA y oxidación en el ciclo de Krebs, -- produce directamente malato. La desaminación oxidativa de la treonina genera amoníaco libre; este se condensa con α -cetoglutarato, vía glutamato deshidrogenasa, formando glutamato. El metabolismo de leucina produce piruvato neto, pero el mecanismo se desconoce - (2, 34, 45, 52, 82). El aspartato es el principal precursor de -- alanina (52, 53). La enzima málica-NADP⁺ citosólica, cataliza la conversión de malato (intermediario de 4 carbonos) a piruvato. Su actividad es suficiente en músculo (1.1 unidades/g) para dar - - cuenta de la velocidad de síntesis y liberación de alanina (2, 44, 45, 52, 82). La cinética de la enzima málica-NADP⁺ de corazón, - de hígado y posiblemente de músculo esquelético, no favorece la -- carboxilación reductiva de piruvato (conversión de piruvato a mala to). En parte se debe a que la enzima tiene un K_m muy elevado pa ra piruvato (6-16 mM) (2, 34). En músculo, la actividad de esta - enzima es relativamente elevada con respecto a las actividades de piruvato carboxilasa (PC) y de fosfoenolpiruvato carboxicinasa - - (PEPCK) (34). El aspartato, isoleucina, valina y treonina son - - también sustratos para la síntesis de glutamato (41, 44, 52, 53).

En el tejido muscular (músculo esquelético y corazón) en diferentes condiciones metabólicas - inanición, diabetes, trabajo muscular - tiene lugar la acumulación neta de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (2, 34, 95, 152). Varias reacciones anapleróticas han sido sugeridas para explicar el incremento mitocondrial de estos metabolitos:

1. El desplazamiento de las reacciones acopladas alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, provee un mecanismo para la conversión de piruvato a oxalacetato y alanina, a expensas de aspartato (2, 34, 152). Estas reacciones pueden incrementar el nivel de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos cuando la concentración de piruvato aumenta en los tejidos (34, 41, 152). Sin embargo, la acumulación de intermediarios pue



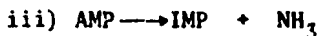
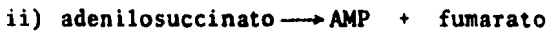
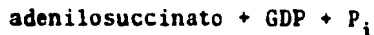
de ocurrir sin el cambio correspondiente en el contenido de glutamato, aspartato o piruvato (2, 34, 152). Experimentalmente se ha comprobado que la acumulación neta de intermediarios es casi igual al aumento del contenido de alanina. Esta relación se explica, sobre bases de estequiometría del carbono, por una transaminación doble entre aspartato y alanina aminotransferasas (34, 152).

2. Otro autor propone que un número de aminoácidos que transami-

nan con α -cetoglutarato, pueden acoplarse a alanina aminotransferasa y producir la reacción neta (34, 152):



3. Otra posible secuencia de reacciones capaces de sintetizar intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, a partir de aminoácidos precursores, es el ciclo nucleótidos de purina propuesto por Thornheim y Lowestein (2, 34, 41, 152). El ciclo utiliza las reacciones catalizadas por las enzimas adenilosuccinato sintetasa (i), adenilosuccinasa (ii) y la adenilato desaminasa (iii), para efectuar la conversión neta de aspartato a fumarato y amoníaco (2, 34, 41, 152). La secuencia nucleótidos de purina puede estar acoplada con otras reacciones de transaminación para repletar la poza de aspartato (2, 34, 52, 152).



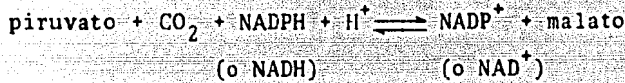
La reacción global es:



El ciclo nucleótido de purina constituye un mecanismo de anaplerosis fundamental en el músculo esquelético durante ejercicio, donde los niveles de ATP están deprimidos (2, 34, 41, 152). El ciclo no provee cantidades importantes del amoníaco (NH_3) re-

querido para la síntesis de urea (41).

4. La carboxilación reductiva de piruvato vía enzimas málicas - NAD^+ (NADP^+) específicas, por razones de cinética enzimática, no es un mecanismo anaplerótico favorable (34):



La reacción de la enzima málica- NAD^+ es irreversible. El equilibrio enzima málica- NADP^+ es reversible, pero la conversión de piruvato a malato es lenta y únicamente es significativa en -- concentraciones extremas de piruvato y de bicarbonato (HCO_3^-) (2, 34).

5. Las enzimas anapleróticas mitocondriales propionil-CoA carboxilasa (PCC) y piruvato carboxilasa (PC). La presencia de PCC en el músculo esquelético ha sido bien establecida. Su importancia fisiológica en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada se acepta en forma amplia (2, 34, 52). La conversión de los aminoácidos (valina e isoleucina) a propionil-CoA e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, involucra el consumo de α -cetoglutarato en el paso inicial de transaminación; parte de su esqueleto carbonado se elimina como α -oxoácidos (2-hidroxiisobutirato) a la sangre (34, 41, 52, 95). La vía PCC parece no dar cuenta del flujo anaplerótico en el tejido muscular. Es posible que ocurra un consumo neto de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (34, 52). La actividad de PC medida en mi

tocondrias de músculo esquelético y corazón es suficiente para -- dar cuenta, en un un lapso de 10-15 min, de la acumulación de intermediarios que se observa en animales diabéticos o en ayuno, o bien en tejido muscular perfundido con acetato (34). La enzima cataliza la carboxilación de piruvato. En mitocondria muscular -



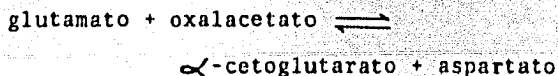
aislada, la PC parece ser tan eficiente como la enzima PCC en la síntesis de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (2, 34). En virtud de que la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y fructosa-1,6-difosfatasa es significativa en el músculo esquelético, se ha postulado que la PC podría contribuir a la síntesis de glucógeno, a partir de la poza piruvato/lactato (2, 34). Sin embargo, la actividad de PC es baja comparada con la velocidad de acumulación de glucógeno en este tejido (2, 34).

La velocidad de operación del ciclo nucleótidos de purina, en músculo esquelético, aumenta durante ejercicio y en la fase de recuperación (2,34). Mediciones, in situ, del contenido de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, en músculo esquelético de animales durante ejercicio, evidenciaron que la velocidad de conversión de IMP a AMP y la actividad de la enzima -- adenilosuccinato sintetasa (limitante de la velocidad en el ciclo nucleótidos de purina) dan cuenta de la velocidad (aumentada) del flujo anaplerótico del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (2). Los niveles de fumarato y malato (generados vía adenilosuccinasa

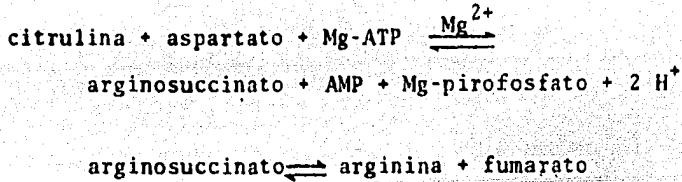
y fumarasa, respectivamente) aumentaron en forma primaria y sustancial. Posteriormente, se elevaron citrato, isocitrato y succinato. Los cocientes malato/fumarato y citrato/isocitrato permanecieron constantes. Los pares redox NADH/NAD^+ y lactato/piruvato se elevaron. El oxalacetato aumentó, pero el α -cetoglutarato no cambió. La suma de los metabolitos totales del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se incrementó. Se acumularon inosín monofosfato (IMP) y ortofosfato. Los niveles de creatina fosfato y de ATP declinaron (2). En la fase inicial de recuperación, los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos retornan a sus niveles iniciales a través de los flujos PEPCK y de la reacción enzimática malica-NAD^+ específica mitocondrial (2).

Durante ejercicio muscular, dependiendo de la intensidad del mismo, aumenta la liberación de alanina (50-500%) desde músculo esquelético (44). La síntesis de alanina es soportada, en parte, por la accesibilidad del piruvato derivado de glucosa. El metabolismo oxidativo de los aminoácidos de cadena ramificada y la conversión de aspartato a oxalacetato, proveen los grupos amino necesarios (41, 44, 102, 104).

El oxalacetato es el precursor de aspartato, se transforma en éste por un equilibrio reversible catalizado por glutamato-aspartato aminotransferasa y en presencia de fosfato de piridoxal como grupo prostético de la enzima.

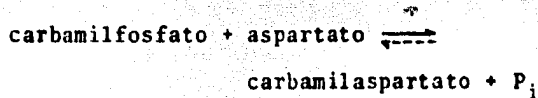


La formación de aspartato suministra un mecanismo para conducir los grupos amino, que derivan del metabolismo oxidativo de los aminoácidos, a la síntesis de urea (9, 87, 165, 177, 180). Las enzimas que catalizan las reacciones proveedoras de grupos amino al ciclo de la urea, particularmente, glutamato-aspartato aminotransferasa, glutamato deshidrogenasa, carbamilo-fosfato sintetasa y ornitín-carbamil transferasa, se localizan intramitocondrialmente en las células hepáticas (87, 164, 165, 170, 177). La capacidad óptima del hígado en la formación de urea, depende de la integridad de los sistemas multienzimáticos activos en el ciclo de la urea y del encausamiento de las fuentes de nitrógeno (grupos α -amino derivados de los aminoácidos) a través de las vías biosintéticas de fosfato de carbamilo y de aspartato (87, 164, 165, 170, 177). El aspartato provee el segundo átomo de nitrógeno de la urea, vía síntesis de arginosuccinato (compuesto intermedio en la formación de arginina) (87, 164, 165, 177, 180). El nitrógeno α -amino cedido por aspartato proviene de la aminotransferación de oxalacetato a partir de glutamato. El glutamato es el producto final, portador de grupos α -amino, al cual convergen las vías catabólicas (transaminaciones) de la mayoría de los aminoácidos (164, 165, 170, 177, 180). El nitrógeno amínico del aspartato se conjuga, reversiblemente, con el átomo de carbono carbamílico de la citrulina, reacción catalizada por arginosuccinato sintetasa, produciendo arginosuccinato (87, 164, 165, 170). La ruptura de arginosuccinato (un aminoácido doble) por arginosuccinato liasa, forma fumarato y arginina la cual porta (en la porción guanidílica) el átomo de nitrógeno que el aspartato cede. El fumarato re-



genera oxalacetato (en mitocondria) a través de su conversión a malato (en citoplasma). El malato entra a la mitocondria, probablemente, por la lanzadera malato-aspartato. El aspartato puede ser también una fuente importante de equivalentes reductores como resultado de su conversión estequiométrica a fumarato en el ciclo de la urea (87, 165, 170, 188).

La síntesis de carbamilaspartato, precursor efectivo de pirimidinas, es catalizada por la enzima aspartato transcarbamilasa. El equilibrio se desplaza extraordinariamente hacia síntesis. La enzima cataliza la etapa crítica en la biosíntesis de pirimidinas



y está expuesta a una inhibición retroactiva de producto final -- por el trifosfato de citidina. El carbamilaspartato experimenta cierre del anillo (vía dihidroorotasa) y oxidación (vía deshidrogenasa del ác. dihidroorótico) produciendo ácido orótico (164, -- 165, 170). Un bloqueo en la utilización de carbamilfosfato mitocondrial, induce su liberación a citoplasma donde es sustrato para la síntesis de carbamilaspartato, dejando un incremento de los precursores de pirimidinas y la aparición de ácido orótico en la orina (87, 143, 164, 165, 170).

El aspartato es el precursor directo de asparagina vía asparagina sintetasa, mecanismo análogo a la glutamina sintetasa -- (96, 192). La asparagina se hidroliza, vía asparaginasa, a aspartato y amoníaco (96, 192).



El β -hemialdehído aspartato, compuesto que deriva del aspartato, es un intermediario en la síntesis de treonina, isoleucina, homoserina y lisina (192).

CAPITULO V
SECCION EXPERIMENTAL

1. PROCEDIMIENTOS PARA LA ESTANDARIZACION DE LAS TECNICAS MICROFLUOROMETRICAS ENSAYADAS

1.1. Metodología.

Los ensayos de estandarización se efectuaron en un lote mixto de plasma ("pool"). Este se obtuvo mezclando alicuotas (850 μ l) de plasma de adultos metabólicamente normales. A tres fracciones (A, B y C) de 5 ml cada una (ver Tablas 1, 2 y 3), inmediatamente antes de desproteínizar, se adicionó una mezcla de sustratos en concentraciones conocidas (concentración adicionada (II), ver Tablas 1, 2 y 3), en un volumen final de 1.0 ml para dar la concentración total (final esperada (I+II), ver Tablas 1, 2 y 3).

Con otra fracción del lote mixto de plasma se determinó la concentración endógena (inicial (I), ver Tablas 1, 2 y 3) de cada metabolito ensayado.

Tabla 1

RECUPERACION DE SUSTRATOS ADICIONADOS A PLASMA (Fracción A)

Mezcla de sustratos en un volumen final de 1.0 ml.	Concentración (μM)			Final observada	Recuperado %
	Inicial (endógena) (I)	Adicionada (II)	Final esperada (I+II)		
α -Cetoglutarato	8.41	12.75	21.16	21.03	99.4
Citrato	104.31	23.41	127.72	128.37	100.5
Glucosa (')	4.28	3.98	8.26	8.12	98.3
Lactato (')	1.69	1.53	3.22	3.20	99.4
Piruvato	111.94	56.82	168.76	175.80	104.2
Alanina	297.2	170.4	467.6	484.45	103.6
β -Hidroxi butirato	181.32	250.0	431.32	418.84	97.1
Acetoacetato	76.21	42.73	118.94	116.85	98.2
Glutamato	108.78	69.82	178.6	182.87	102.4
Glutamina	445.93	227.0	672.93	681.53	101.3
Aspartato	44.04	28.41	72.45	70.81	97.7

(') $\mu\text{M} \times 10^3$

Tabla 2
RECUPERACION DE SUSTRATOS ADICIONADOS A PLASMA (fracción B)

Mezcla de sustratos en un volumen final de 1.0 ml	Concentración (μM)			Final observada	Recuperado %
	Inicial (endógena) (I)	Adicionada (II)	Final esperada (I+II)		
α -Cetoglutarato	8.41	40.6	49.01	50.56	103.2
Citrato	104.31	175.6	279.91	272.16	97.2
Glucosa (')	4.28	1.08	5.36	5.4	100.7
Lactato (')	1.69	3.07	4.76	4.81	101.5
Piruvato	111.94	340.9	452.84	435.82	96.2
Alanina	297.2	454.5	751.7	760.84	101.2
β -Hidroxi butirato	181.32	625.0	806.32	818.65	101.5
Acetoacetato	76.21	107.0	183.21	184.59	100.7
Glutamato	108.78	232.73	340.51	345.26	101.4
Glutamina	445.93	682.0	1.127.93	1.113.08	98.7
Aspartato	44.04	136.0	180.04	183.82	102.1

(') $\mu\text{M} \times 10^3$

Tabla 3
RECUPERACION DE SUSTRATOS ADICIONADOS A PLASMA (fracción C)

Mezcla de sustratos en un volumen final de 1.0 ml.	Concentración (μM)				Recuperado %
	Inicial (endógena) (I)	Adicionada (II)	Final esperada (I+II)	Final observada	
α -Cetoglutarato	8.41	6.4	14.81	14.93	100.8
Citrato	104.31	100.0	204.31	202.67	99.2
Glucosa (')	4.28	2.44	6.72	6.73	100.1
Lactato (')	1.69	1.02	2.71	2.72	100.4
Piruvato	111.94	102.27	214.21	215.0	100.4
Alanina	297.2	56.82	354.02	354.41	100.1
β -Hidroxiutarato	181.32	188.0	369.32	384.39	104.1
Acetoacetato	76.21	160.0	236.21	229.73	97.3
Glutamato	108.78	151.0	259.78	248.13	95.5
Glutamina	445.93	454.5	900.43	949.88	105.5
Aspartato	44.04	79.54	123.58	121.04	97.9

(') $\mu\text{M} \times 10^3$

1.2. Preparación del extracto neutro de plasma.

El plasma fue recuperado de sangre venosa colectada sin -- constricción en jeringa heparinizada. Inmediatamente se adicionó a un volumen igual (relación 1:1) de una solución fría de -- HClO_4 1 M. Después de mezclado se centrifugó a 0°C por 10 min y 3,600 rpm. El sobrenadante fue neutralizado, pH 6.8-7.2, con -- una solución fría de KHCO_3 3M. Las muestras permanecieron en reposo, por 10 min, sobre baño de hielo para asegurar la precipitación completa del KClO_4 . Después de centrifugar a 0°C por 10 -- min y 3,600 rpm. se separó el extracto neutro el cual se conservó a -20°C hasta su utilización.

1.3. Parámetros de estandarización de las técnicas.

Exactitud.- El porcentaje de recuperación de cada uno de los sustratos adicionados en concentraciones conocidas al lote -- mixto de plasma ("pool") fue calculado de la relación entre la -- concentración final observada y la concentración final esperada - (ver tablas 1, 2 y 3) y determinó la exactitud de la técnica respectiva.

Especificidad.- Midiendo la recuperación de cada uno de -- los sustratos adicionados en concentraciones conocidas al lote -- mixto de plasmas ("pool") en presencia de una mezcla de sustratos interferentes se determinó la especificidad de cada técnica micro fluorométrica ensayada (ver tablas 1, 2 y 3).

Precisión.- La cuantificación de la variabilidad intra-en sayos, valoración del sustrato específico efectuada en una misma ocasión y en un sistema de ensayo constante, permitió establecer la precisión de la metodología respectiva.

Reproducibilidad.- La variabilidad inter-ensayos, medición del sustrato específico contenido en el lote mixto de plasmas valorado en ocasiones diferentes pero en un sistema de ensayo constante, representó la reproducibilidad de cada técnica experimentada.

Sensibilidad.- Los métodos microenzimáticos desarrollados son sistemas de oxidorreducción dependientes de piridín nucleótidos. Las reacciones que ocurren en cada sistema de ensayo específico son estequiométricas. El cambio en la concentración del nucleótido oxidado (βNAD^+ , βNADP^+) o reducido (βNADH , βNADPH) medido como un aumento o disminución de la fluorescencia emitida es equivalente a la cantidad del sustrato presente en la mezcla de reacción adecuada. Las condiciones de lectura del fluorómetro se establecieron considerando la longitud máxima de excitación (365 nm) y la longitud máxima de emisión fluorescente (460 nm) de los nucleótidos reducidos (βNADH , βNADPH). La elección de la longitud máxima de emisión fluorescente, no siempre corresponde al pico del espectro fluorescente, es determinada por la relación óptima entre las lecturas fluorométricas de las muestras a valorar y los "blancos". La selección adecuada de los filtros primarios de excitación y de los filtros secundarios de emisión

reduce al mínimo la fluorescencia de los reactivos y de otros compuestos interferentes. La estimación de la sensibilidad del ensayo microfluorométrico específico se ajusta a la concentración - del nucleótido oxidado o reducido usado en el sistema de reacción. Los límites de sensibilidad útil están dados por factores de ins-strumentación. La sensibilidad directa útil es confiable si el - ensayo se basa en las diferencias entre dos lecturas efectuadas - antes y después de la adición de la mezcla reactiva específica. En fluorometría analítica pueden medirse concentraciones de β NADH o β NADPH de $0.1-10 \mu\text{M}$ equivalente a 0.1×10^{-9} moles contenidas en un volumen final de 1.0 ml. Los procedimientos fluorométricos - son más sensibles que la espectrofotometría en un orden de magni-tud de casi 10^3-10^4 . Esta metodología permite obtener límites - de sensibilidad muy amplios. La no linealidad entre la lectura fluorométrica y la concentración de la molécula fluorescente ocu-rre a niveles detectables muy pequeños, factor de 10^4-10^5 .

Las mediciones fluorométricas fueron hechas en un fluoróme-tro de filtros TURNER. Se empleó como fuente de luz una lámpara UV # 110-850, aísla la línea de Hg en 365 a 405 nm. Se utilizó como filtro primario el # 110-810 (7-60) que aísla la línea de - Hg a 365 nm, y como filtros secundarios los #(s) 110-816 (2A) y el 110-831 (48). El sistema complejo de filtros secundarios dió una transmisión máxima de 460 nm. Los filtros de densidad neu--tra #(s) 110-823L (10% de transmitancia) y el 110-812M (1% de -- transmitancia) se adicionaban a los filtros secundarios cuando - era requerido. La intensidad de la luz incidente sobre la mues--

tra fue controlada ajustando la escala selectora del flurómetro a sensibilidad IX, 3X, 10X o bien 30X.

1.4. Preparación del extracto neutro de soluciones estandar.

Las soluciones estandar puras, empleadas para el trazo de la curva estandar respectivamente, de cada metabolito ensayado -- (glucosa, piruvato, lactato, alanina, β -hidroxibutirato, acetoa cetato, citrato, α -cetogluturato, glutamato, glutamina y aspar tato) fueron tratadas de manera similar que las muestras biológi cas (plasma) para la obtención de los extractos neutros (ver - - "Preparación del extracto neutro de plasma" p. 168). La mezcla ácida estandar- HC10_4 específica fue neutralizada, pH 6.8-7.2, -- con una solución fría de KHCO_3 3M. Los extractos neutros recu perados se usaron para el trazo de la curva estandar adecuada. Las soluciones estandar se procesaban al momento de efectuarse - el ensayo.

2. EL PERFIL METABOLICO BASAL DE NIÑOS Y ADULTOS DE UNA POBLACION MEXICANA NORMAL

2.1 Selección de la población normal estudiada

Los niveles normales de metabolitos -incluyendo α -cetoglutarato, citrato, glucosa, lactato, piruvato, alanina, β -hidroxibutirato, acetoacetato, glutamato, glutamina y aspartato- en plasma de 12 niños con edades que fluctuaban entre 1 mes-13 días, hasta 14 años 2 meses, se obtuvieron de pacientes metabólicamente -- normales de la Unidad de Genética del Instituto Nacional de Pediatría DIF. Tres de estos niños presentaban un diagnóstico presuntivo de ambigüedad genital (RTE), de síndrome dismorfológico - - (GMV) y probable síndrome de Sotos (VPG). Los valores normales - de metabolitos, ya mencionados arriba, en plasma de 15 adultos cuyas edades fluctuaban entre 19 años hasta 45 años se obtuvieron - de una población metabólicamente normal de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. Todas las muestras se tomaron en condiciones de ayuno durante toda la noche y previamente a su extracción el paciente permaneció en reposo por 45 min. El plasma fue recuperado de sangre venosa colectada sin constricción y en jeringa heparinizada. Inmediatamente se procedió a obtener el extracto neutro de plasma (ver - - "Preparación del extracto neutro de plasma" p.168) el cual fue conservado a -20°C hasta su utilización. Los extractos neutros se usaron para medir por procedimientos enzimáticos-fluorométricos - los valores normales de metabolitos en plasma de la población infantil (ver tablas 4 y 5) y de la población de adultos (ver tablas 6 y 7).

2.2. VALORES NORMALES DE METABOLITOS EN PLASMA DE LA POBLACION INFANTIL ESTUDIADA
(μ M), N=12

Tabla 4

Metabolito	M \pm S	Límites	Valores Reportados	Referencias
α -Cetoglutarato	11.15 \pm 0.5	8.82 - 14.93	5.0 - 26.2	(76)
Citrato	95.47 \pm 6.97	55.6 - 145.84	81.0 \pm 18.0	(37,98)
Glucosa (')	4.65 \pm 0.19	3.51 - 5.6	3.89- 5.55	(43,98)
Lactato (')	1.32 \pm 0.13	0.66 - 1.93	0.55- 2.2	(126,208)
Piruvato	102.39 \pm 6.15	78.29 - 141.38	54.0 - 244.0	(76,182)
Alanina	236.15 \pm 23.42	146.35 - 432.43	140.0 300.0	(38,69,173)
β -Hidroxi butirato	179.37 \pm 27.43	71.6 - 388.02	50.0 - 600.0	(43)
Acetoacetato	52.81 \pm 6.32	25.58 - 93.35	< 100.0	(182)
Glutamato	70.82 \pm 7.12	45.85 - 132.30	14.28 - 191.76	(37,71,183)
Glutamina	493.18 \pm 26.46	350.07 - 626.75	414.5 - 693.58	(38,43,183)
Aspartato	17.24 \pm 1.95	7.79 - 29.64	12.2 \pm 3.4	(37,71)
L/P	13.58 \pm 1.61	4.67 - 23.5	8.0 - 20.0	(43,155,208)
Ala/Pir	2.30 \pm 0.16	1.59 - 3.59	1.0 - 2.0	(155)
β -HB/AcAc	3.30 \pm 0.19	2.26 - 4.46	2.0 - 4.0	(155,182)

(') μ Mx10³

2.2. VALORES NORMALES DE METABOLITOS EN PLASMA DE LA POBLACION
INFANTIL ESTUDIADA (μM), N=12

Tabla 5

Metabolito	M \pm S		-2S	+2S
α -Cetoglutarato	11.15 \pm	1.72	7.72	14.58
Citrato	95.47 \pm	24.16	47.14	143.8
Glucosa (')	4.65 \pm	0.64	3.36	5.93
Lactato (')	1.32 \pm	0.44	0.45	2.19
Piruvato	102.39 \pm	21.32	59.75	145.03
Alanina	236.15 \pm	81.13	73.89	398.41
β -Hidroxibutirato	179.37 \pm	95.01	-10.65	369.4
Acetoacetato	52.81 \pm	21.88	9.05	96.58
Glutamato	70.82 \pm	24.66	21.49	120.14
Glutamina	493.18 \pm	91.65	309.88	676.48
Aspartato	17.24 \pm	6.75	3.73	30.74
L/P	13.58 \pm	5.59	2.4	24.76
Ala/Pir	2.30 \pm	0.56	1.19	3.42
β -HB/AcAc	3.30 \pm	0.66	1.98	4.63
(') $\mu\text{M} \times 10^3$				

2.3. VALORES NORMALES DE METABOLITOS EN PLASMA DE LA POBLACION DE ADULTOS ESTUDIADA
(μ M), N=15

Tabla 6

Metabolito	M \pm S	Límites	Valores Reportados	Referencias
α -Cetoglutarato	8.65 \pm 0.57	6.78 - 12.89	5.53 \pm 0.31	(76)
Citrato	119.37 \pm 6.5	73.66 - 163.9	88.0 - 156.0	(37,98)
Glucosa (')	4.69 \pm 0.20	3.49 - 6.0	4.16 - 5.27	(98)
Lactato (')	1.5 \pm 0.1'	0.89 - 2.47	0.66 - 1.89	(98,126)
Piruvato	104.23 \pm 4.77	78.29 - 145.0	81.0 - 85.0	(76,98)
Alanina	240.58 \pm 23.72	153.04 - 510.46	277.0 \pm 12.0	(38,69)
β -Hidroxiutarato	185.66 \pm 25.33	58.93 - 438.8	50.0 - 600.0	(43)
Acetoacetato	58.26 \pm 6.72	20.46 - 112.55	18.0 - 78.0	(116,182)
Glutamato	76.37 \pm 6.11	35.7 - 106.16	14.28 - 191.76	(37,71)
Glutamina	476.76 \pm 18.58	383.75 - 628.29	523.0 \pm 105.0	(37,71)
Aspartato	34.43 \pm 3.12	14.62 - 52.25	11.0 - 54.0	(216,231)
L/P	14.70 \pm 0.97	8.39 - 21.08	10.0 - 15.0	(155,182)
Ala/pir	2.27 \pm 0.14	1.43 - 3.5	1.0 - 2.0	(155)
β -HB/AcAc	3.15 \pm 0.15	1.96 - 3.9	2.0 - 4.0	(155)

(') μ Mx10³

2.3. VALORES NORMALES DE METABOLITOS EN PLASMA DE LA POBLACION DE ADULTOS ESTUDIADA (μM), N=15

Tabla 7

Metabolito	M \pm S	-2S	+2S
α -Cetoglutarato	8.65 \pm 2.21	4.23	13.06
Citrato	119.37 \pm 25.17	69.04	169.7
Glucosa (')	4.69 \pm 0.77	3.16	6.23
Lactato (')	1.5 \pm 0.37	0.75	2.25
Piruvato	104.23 \pm 18.48	67.27	141.18
Alanina	240.58 \pm 91.86	56.85	424.31
β -Hidroxibutirato	185.66 \pm 98.12	-10.58	381.9
Acetotacetato	58.26 \pm 26.05	6.17	110.36
Glutamato	76.37 \pm 23.65	29.08	123.67
Glutamato *	476.76 \pm 71.96	332.85	620.68
Aspartato	34.43 \pm 12.09	4.49	51.98
L/P	14.70 \pm 3.75	7.19	22.21
Ala/Pir	2.27 \pm 0.55	1.18	3.37
β -HB/AcAc	3.15 \pm 0.59	1.98	4.33
(') $\mu\text{M} \times 10^3$			

3. MONTAJE DE LAS TECNICAS MICROFLUOROMETRICAS ENZIMATICAS PARA LA MEDICION DE LOS METABOLITOS INCLUIDOS EN ESTA TESIS

3.1. Procedimiento analítico para la determinación de glucosa.

Método de Lowry, O.H. y Passonneau, J.V. (99)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer tris-HCl 100 mM pH 8.1
2. Adenosina-5'-trifosfato (ATP) 10 mM pH 7.0
3. Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP) 100 mM
4. Hexocinasa (HK) stock original diluido con buffer tris-HCl 20 mM pH 8.0
5. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) stock original diluido con buffer tris-HCl 20 mM pH 8.0
6. Ditiotreitól 100 mM
7. Cloruro de magnesio 100 mM (Merck)
8. Solución stock de glucosa 100 mM (Merck)

(') De Sigma Ch.Co.St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue experimentada con alícuotas ($5\mu\text{l}$) - de cada uno de los extractos neutros de las soluciones estandar - (1, 2, 3, 4,5,6,7 y 8 mM) de glucosa. Correspondía a ésta una - amplitud de 2 a 18 nmol de glucosa por volumen de reactivo analí- tico (1.0 ml). Alícuotas de $5-10\mu\text{l}$ de los extractos neutros de las muestras fueron valoradas.

En cada serie de estimaciones se ensayaron, en forma para- lela, los estandares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer tris-HCl 50 mM pH 8.1, MgCl_2 1 mM, ditiotrei- tol $500\mu\text{M}$, ATP $300\mu\text{M}$, NADP $50\mu\text{M}$ y G6P-DH 20 mU, todo esto con- tenido en un volumen final de 1.0 ml. Después que se adicionó - el problema, los tubos de reacción reposaron (2-4 min) a tempera- tura ambiente, a fin de que ocurriera la oxidación de glucosa-6-P endógena en las muestras. El fluorómetro se ajustó a sensibili- dad 10X e inclusión del filtro neutro 10%. La lectura inicial (UF_1) fue tomada a priori a la adición de la enzima HK ($10\mu\text{l} = 0.14 \text{ U}$). El tiempo óptimo de reacción fue de 12 min.

La solución stock de glucosa fue valorada en una mezcla de reacción que consistió en buffer tris-HCl 50 mM pH 8.1, MgCl_2 -- 1 mM, ATP $500\mu\text{M}$, NADP $500\mu\text{M}$, HK 0.28 U y G6P-DH 0.08 U, todo es- to contenido en un volumen final de 1.0 ml. La lectura inicial (DO_1) se tomó antes de incorporar la glucosa ($10\mu\text{l} = 100\mu\text{mol}$). La lectura final (DO_2) se leyó a los 6 min de reacción.

Resultados y Discusión

Conforme al principio de reacción en el sistema de ensayo, la cantidad de NADPH producido resultó directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en una amplitud de 2 a 18 μ M -- por tubo analítico (Fig. 1).

La precisión del método (mM) fue de 4.28 ± 0.10 (M \pm ES), N=5 y un C.V. de 5.3%. La variabilidad inter-ensayos resultó de 4.21 ± 0.12 (M \pm ES), N=4 y un C.V. de 6.0% (tablas 1,2,3). La frecuente descongelación de los extractos neutros no alteró la estabilidad de glucosa en las muestras. En condiciones idénticas de ensayo, una muestra valorada en ocasiones diferentes, dió resultados reproducibles. Los ensayos múltiples de recuperación de cantidades conocidas de glucosa, inclusive en presencia de -- otros sustratos, dieron un porcentaje de 100.2 ± 2.08 (M \pm ES), N=3 (tablas 1,2,3). Los datos establecieron la especificidad inherente de la reacción enzimática y mostraron que la medición de glucosa es cuantitativa (tablas 1,2,3).

Los valores de glucosa (mM) en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de 4.65 ± 0.19 (M \pm ES), N=12 y de 4.69 ± 0.20 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

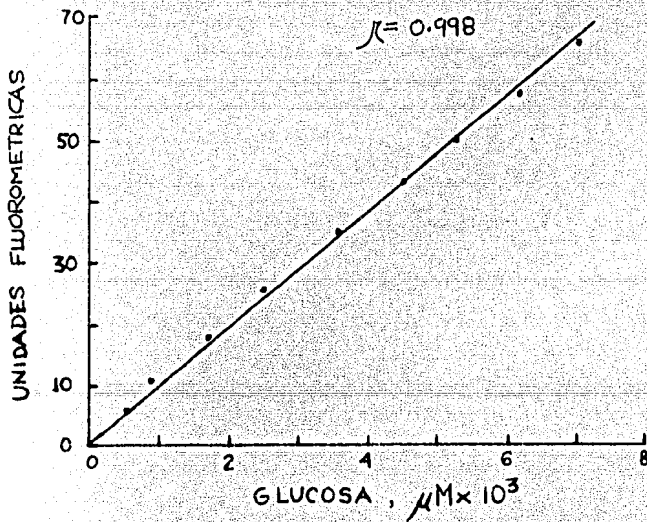


Fig. 1. Concentración de glucosa contra lectura - fluorométrica neta para una concentración de $50 \mu\text{M}$ de NADP^+ en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

3.2. Procedimiento analítico para la determinación de piruvato.

Método de Lowry, O.H. y Passonneau, J.V. (99)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer fosfato 100 mM pH 7.0
2. Nicotinamida-adenina dinucleótido reducido (NADH) 5 mM en buffer carbonato 100 mM pH 10.6
3. Lactato deshidrogenasa (LDH) stock original diluido con - buffer tris-HCl 20 mM pH 8.0
4. Solución stock de piruvato sódico 100 mM

(') De Sigma Ch. Co. St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue experimentada con alícuotas (10 μ l) de cada una de las soluciones estandar puras (20, 60, 100, 140, 180, 220, 260, 300 y 340 μ M) de piruvato. Representó niveles límites de 0.2 a 3.4 nmol de piruvato por volumen de reactivo - analítico (1.0 ml). De forma alternativa, otra curva estandar - fue ensayada con fracciones (20 μ l) de cada uno de los extractos neutros de las soluciones estandar (50, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 μ M) de piruvato. Correspondía a ésta una ampli

tud de 0.43 a 4.3 nmol de piruvato por tubo analítico. Se emplearon alícuotas (10-20 μ l) de los extractos neutros de muestras para su valoración.

En cada serie de estimaciones se ensayaron, en forma concomitante, los estándares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 y NADH 5 μ M, ambos en un volumen final de 1.0 ml. El fluorómetro se ajustó a sensibilidad 30X e inclusión del filtro neutro 10%. La lectura inicial (UF_1) se efectuó después de la adición, en forma conveniente, del problema. Se incorporó la enzima LDH (10 μ l = 0.05 U) y el tiempo óptimo de reacción fue de 10 min. La curva estándar en niveles límites de 0.43 a 4.3 nmol de piruvato por tubo analítico, se ensayó en un sistema de reacción similar al descrito arriba, excepto que la concentración del nucleótido se incrementó a 10 μ M. Las lecturas se efectuaron a sensibilidad 10X e inclusive el filtro-neutro 10%.

La solución stock de piruvato fue valorada en una mezcla de reacción compuesta por buffer fosfato 50 mM, NADH 75 μ M y LDH 0.1 U, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. Después de transferido el estándar (5 μ l = 50 nmol) de piruvato, el tiempo óptimo de reacción fue de 6 min.

Resultados y Discusión

Conforme al principio de reacción estequiométrica en el sistema de ensayo, la cantidad de NADH oxidada y medida por el

decremento en fluorescencia resultó equivalente a la cantidad de piruvato presente. Esta proporcionalidad directa fue consistente cuando el piruvato fue medido en niveles límites de 0.2 a 3.4 μM y de 0.43 a 4.3 μM por volumen de reactivo analítico (Fig.2). La sensibilidad del ensayo fue dada por la cantidad del NADH presente en la reacción, la cual determinó el ajuste de sensibilidad del fluorómetro.

La precisión del método (μM) fue de 111.94 ± 5.15 ($M \pm ES$), $N=5$. La variabilidad inter-ensayos resultó de 112.46 ± 5.03 ($M \pm ES$), $N=4$ (Tablas 1,2,3). En condiciones idénticas de ensayo, una muestra valorada en ocasiones diferentes, dió resultados reproducibles. La descongelación sucesiva de las muestras no afectó la estabilidad del piruvato presente. La recuperación de piruvato exógeno, inclusive en presencia de otros sustratos, resultó de 102.73 ± 5.1 ($M \pm ES$), $N=3$. La técnica dió recuperaciones cuantitativas (Tablas 1,2,3). La presencia de otros sustratos no alteró la especificidad de la reacción enzimática.

Los valores de piruvato en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron (μM) de 102.39 ± 6.15 ($M \pm ES$), $N=12$ y de 102.82 ± 4.16 ($M \pm ES$), $N = 15$, respectivamente.

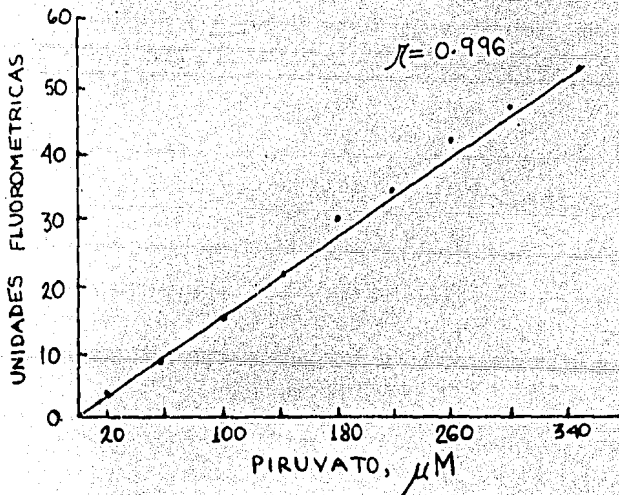


Fig. 2. Concentración de piruvato vs. lectura fluorométrica neta para una concentración de $5\mu\text{M}$ de NADH en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

3.3. Procedimiento analítico para la determinación de lactato.

Método de Lowry, O.H., y Passonneau, J.V. (99)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer 2-Amino-2-metil-1-propanol 200 mM pH 10.0
2. Buffer hidrazina 400 mM pH 9.7
3. Nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) 10 mM
4. Lactato deshidrogenasa (LDH) suspensión original diluida con buffer tris-HCl 20 mM pH 8.0
5. Solución stock de lactato de litio 100 mM

(') Adquiridos de Sigma Ch. Co. St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue experimentada con alícuotas (5 μ l) de cada uno de los extractos neutros de las soluciones estandar (1, 2, 3, 4 y 5 mM) de lactato. Correspondió a ésta una amplitud de 2 a 12 nmol de lactato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). Alícuotas de 5-10 μ l de los extractos neutros de las

muestras fueron valoradas.

En cada serie de mediciones se ensayaron, en forma paralela, los estándares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer 2-amino-2-metil-1-propanol 100 mM pH 10.0, -- hidrazina 100 mM y NAD 200 μ M, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. Las lecturas fluorométricas se efectuaron a -- sensibilidad 10X e inclusive el filtro neutro 10%. La UF_1 se -- tomó después de la adición, en forma adecuada, del problema. Después de incorporada la enzima LDH (10 μ l = 8.0 U) la reacción se completó en 10 min. La inclusión de blancos fue imprescindible.

El stock de lactato fue valorado en una mezcla analítica -- que consistió en buffer hidrazina 200 mM pH 9.6 y NAD 2 mM, ambos contenidos en un volumen final de 1.0 ml. La DO_1 fue tomada después de haber transferido el estándar (50 μ l = 50 nmol) de lactato. La enzima LDH (10 μ l = 20 U) inició la reacción, la cual -- ocurrió en 10 min.

Resultados y Discusión

La reducción de NAD^+ en presencia de LDH y concentraciones crecientes de lactato procedió de forma estequiométrica en el sistema de ensayo. La cantidad de NADH producido, detectada como un aumento en fluorescencia, fue directamente proporcional a la cantidad de lactato presente en una amplitud de 2 a 12 μ M por volumen de reactivo analítico (Fig. 3).

La precisión del método fue de 1.69 ± 0.02 (M \pm ES) N=5 y un C.V. 2%. La reproducibilidad resultó de 1.68 ± 0.02 (M \pm ES), N=4 y un C.V. de 2.04% (Tablas 1,2,3). Una misma concentración de lactato valorada en un sistema de ensayo idéntico y en ocasiones diferentes dió lecturas de fluorescencia similar cada vez. La recuperación de cantidades conocidas de lactato - incorporado a plasma, inclusive en presencia de otros sustratos, dió $100.4 \pm 0.88\%$ (M \pm ES), N=3. La técnica dió recuperaciones cuantitativas. Los resultados confirmaron la especificidad del método (Tablas 1,2,3).

Los valores de lactato en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de (mM) 1.32 ± 0.13 (M \pm ES), N=12 y de 1.5 ± 0.10 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

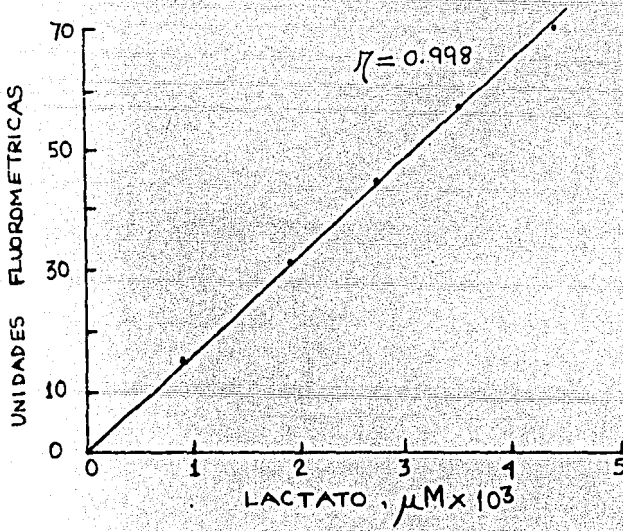


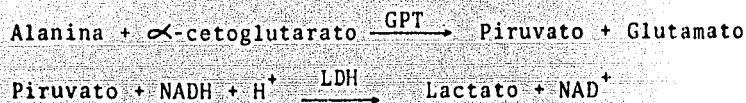
Fig. 3. Concentración de lactato vs. lectura fluorométrica neta para una concentración de $200 \mu\text{M}$ de NAD en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

3.4. Procedimiento analítico para la determinación de alanina.

Método de Lowry, O.H. y Passonneau, J.V. (99)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer tris-HCl 100 mM pH 8.1
2. Nicotinamida-adenina dinucleótido reducido (NADH) 5 mM en -- buffer carbonato 100 mM pH 10.6
3. Glutamato-piruvato transaminasa (GPT) stock original diluido en buffer tris-HCl 20 mM pH 8.0
4. Lactato deshidrogenasa, LDH, stock original diluido con buffer tris-HCl 20 mM pH 8.0
5. Solución stock de ácido α -cetoglutárico 100 mM pH 8.0
6. Solución stock de alanina 100 mM

(') Preparaciones comerciales de Sigma Ch. Co. St. Louis MO.

Otros reactivos empleados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue ensayada con alícuotas (10 μ l) de -- cada uno de los extractos neutros de las soluciones estandar - - (100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 y 550 μ M) de alanina. Correspondió a ésta una amplitud de 0.4 a 2.5 nmol de alanina.

na por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). De manera alternativa, otra curva estandar fue experimentada con fracciones - - (10 μ l) de cada una de las soluciones estandar puras (100, 150, - 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 y 550 μ M) de alanina por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). Aliquotas de 10-20 μ l de los extractos neutros de las muestras fueron determinadas.

En cada serie de estimaciones se analizaron, en forma paralela, los estandares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer tris-HCl 50 mM pH 8.1, NADH 6 μ M, α -cetoglutarato 50 μ M y LDH 0.23 U, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. Después de que se adicionó el problema, en forma conveniente, los tubos de reacción reposaron (10 min) a temperatura ambiente a fin de que ocurriera la reducción del piruvato endógeno en las muestras. El fluorómetro fue ajustado a sensibilidad 30X e inclusive el filtro neutro 10 λ . La lectura inicial - - (UF_1) fue realizada antes de que se adicionara la enzima GPT - - (10 μ l = 8.0 U). La lectura final se tomó a los 20 min de reacción.

La solución stock de alanina fue valorada en una mezcla -- analítica constituida por buffer tris-HCl 50mM pH 8.1, NADH 125. - μ M, α -cetoglutarato 200 μ M, GPT 8.0 U y LDH 0.4 U, todo esto -- contenido en un volumen final de 1.0 ml. La lectura inicial - - (DO_1) se tomó antes de adicionar la alanina (10 μ l = 100 nmol). - La lectura final se leyó a los 25 min de reacción.

Resultados y Discusión

El sistema de ensayo se fundamentó en la conversión de alanina a piruvato por GPT y la medición del piruvato formado por la oxidación acoplada de NADH en presencia de LDH. Este mecanismo de reacción acoplada procedió de forma cuantitativa en una amplitud límite de 0.4 a 2.5 μM y de 1.0 a 5.5 μM de alanina por volumen de reactivo analítico. La cantidad de NADH oxidado y medida por el decremento en fluorescencia resultó igual a la cantidad de alanina presente (Fig. 4). La sensibilidad del ensayo fue dada por la cantidad del NADH (6 μM) presente en la reacción, la cual determinó el ajuste de sensibilidad del fluorómetro.

La precisión del método (μM) fue de 297.2 ± 3.18 (M+ES), N=5 y un C.V. de 2.4%. La variabilidad inter-ensayos resultó de 295.9 ± 3.8 (M + ES), N=4 y un C.V. de 2.5% (Tablas 1,2,3). Una misma concentración de alanina valorada en un sistema de ensayo idéntico y en ocasiones diferentes dió lecturas de fluorescencia similares cada vez. La frecuente congelación y descongelación de los extractos neutros no alteró la estabilidad de alanina en las muestras. Los ensayos de recuperación de cantidades conocidas de alanina adicionadas a plasma, inclusive en presencia de otros sustratos, dieron un porcentaje de 104.2 ± 2.9 (M + ES), N=3 (Tablas 1,2,3). La técnica dió recuperaciones cuantitativas y no ocurrieron reacciones inespecíficas.

Los valores de alanina (μM) en plasma de niños y adultos

normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de 236.15 ± 23.42 (M \pm ES), N=12 y de 240.58 ± 23.72 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

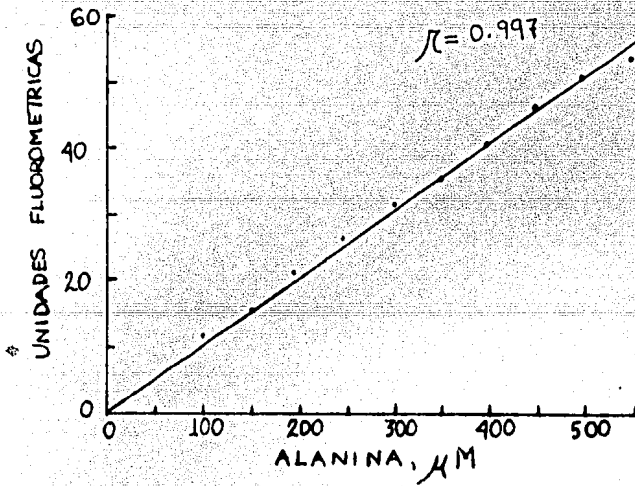


Fig. 4. Concentración de alanina vs. lectura fluorométrica neta para una concentración de $6 \mu\text{M}$ de NADH en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

3.5. Procedimiento Analítico para la Determinación de β -Hidroxiacetato.

Método de D.A.B. Young and A.E. Renold, modificado (209).

Principio



Reactivos (')

1. Buffer carbonato 0.75 M pH 9.5 (Baker)
2. Nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) 10 mM
3. 3-Hidroxiacetato deshidrogenasa (HBDH) stock original diluido con buffer carbonato 50 mM pH 9.5
4. Solución stock de ácido 3-hidroxiacético (sal sódica) 100 mM

(') De Sigma Ch. Co. St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue experimentada con alícuotas (25 μ l) de cada uno de los extractos neutros de las soluciones estandar (150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 y 1200 μ M) de β -hidroxiacetato. Representó niveles límites de 1.5 a 12.5 nmol de β -hidroxiacetato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). De

forma alternativa, otra curva estandar fue ensayada con fracciones ($25 \mu\text{l}$) de cada una de las soluciones estandar puras (20, - 60, 100, 140, 180 y $220 \mu\text{M}$). Correspondió a ésta una amplitud de 0.5 a 5.5. nmol de β -hidroxibutirato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). Alicuotas de 10 - $25 \mu\text{l}$ de los extractos neutros de las muestras fueron empleadas para su valoración.

En cada serie de mediciones se ensayaron, en forma concomitante, los estandares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer carbonato 250 mM pH 9.5 y NAD $150 \mu\text{M}$, - ambos contenidos en un volumen final de 1.0 ml. En el caso de la curva estandar en niveles límites de 1.5 a 12.5 nmol de β -hidroxibutirato, las lecturas fluorométricas se efectuaron a sensibilidad 10X e inclusive el filtro neutro 10%. Si el β -hidroxibutirato era medido en una amplitud de 0.5 a 5.5 nmol, el fluorómetro se ajustaba a sensibilidad 3X e inclusive el filtro neutro 10%. La lectura inicial (UF_1) se tomó después de la adición, en forma conveniente, del problema. Se incorporó la enzima ($10 \mu\text{l} = 15 \text{ mU}$). La lectura final se efectuó (UF_2) a los 35 min de reacción.

La solución stock de β -hidroxibutirato fue valorada en una mezcla de reacción que consistió en buffer carbonato 250 mM pH 9.5 y NAD $300 \mu\text{M}$, ambos contenidos en un volumen final de 1.0 ml. La DO_1 se tomó después de la adición de β -hidroxibutirato ($50 \mu\text{l} = 50 \text{ nmol}$). Posterior a la incorporación de la enzima HBDH ($10 \mu\text{l} = 50 \text{ mU}$) y transcurridos 35 min de reacción se leyó la DO_2 .

Resultados y Discusión

El cambio máximo en fluorescencia debido a la reducción de NAD, en presencia de HBDH y cantidades crecientes de β -hidroxibutirato procedió de forma estequiométrica (Fig. 5). Esta relación directamente proporcional fue consistente cuando el β -hidroxibutirato fue medido en niveles de 1.5 a 12.5 μM y de 0.5 a 5.5 μM por volumen de reactivo analítico.

La precisión de la metodología (μM) fue de 181.32 ± 4.01 (M \pm ES), N=5 y un C.V. de 4.9%. La variabilidad inter-ensayos resultó de 181.32 ± 5.18 (M \pm ES), N=4 y un C.V. de 5.7% (Tablas 1, 2, 3). Una misma muestra valorada en condiciones idénticas de ensayo y en ocasiones diferentes dió resultados reproducibles. La frecuente congelación y descongelación de las muestras no afectó la estabilidad de β -hidroxibutirato presente. La recuperación de cantidades conocidas de β -hidroxibutirato adicionado a plasma, inclusive en presencia de otros sustratos, resultó de $102.0 \pm 3.76\%$ (M \pm ES), N=3 (Tablas 1, 2, 3). La técnica dió recuperaciones cuantitativas, resultados que aluden a la especificidad del método enzimático.

Los valores de β -hidroxibutirato (μM) en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de 179.37 ± 27.43 (M \pm ES), N=12 y de 185.66 ± 25.33 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

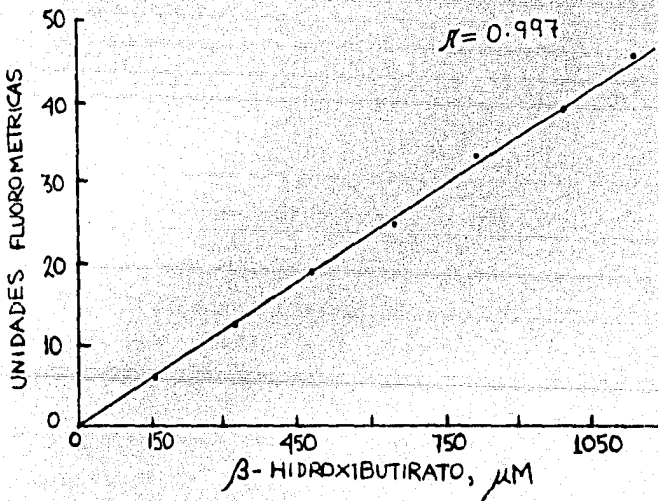


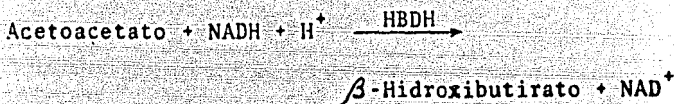
Fig. 5. Concentración de β -hidroxibutirato vs. lectura fluorométrica neta para una concentración de $150 \mu\text{M}$ de NAD en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

3.6. Procedimiento analítico para la determinación de acetoacetato.

Método modificado de D.A.B. Young and A.E. Renold (209)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer fosfato 100 mM pH 7.0 (Merck)
2. Nicotinamida-adenina dinucleótido reducido (NADH) 5 mM en buffer carbonato 100 mM pH 10.6
3. 3-Hidroxiacetato deshidrogenasa (HBDH) suspensión original diluida con buffer fosfato 25 mM pH 7.0
4. Solución stock de ácido acetoacético 100 mM

(') De Sigma Ch. Co. St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estándar fue experimentada con alícuotas ($10 \mu\text{l}$) de cada una de las soluciones estándar puras (20, 40, 60, 80, 100, 140 y $180 \mu\text{M}$) de acetoacetato. Representó concentraciones límites de 0.20 a 1.8 nmol de acetoacetato por volumen de -

reactivo analítico (1.0 ml). Alícuotas de 10-20 μ l de los extractos neutros de las muestras fueron valoradas.

En cada serie de mediciones se ensayaron, en forma paralela, los estándares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 y NADH 6 μ M, ambos contenidos en un volumen final de 1.0 ml. El fluorómetro fue ajustado a sensibilidad 30X e inclusive el filtro 10%. La lectura inicial (UF_1) se tomó después de la adición, en forma adecuada, del problema. Se incorporó la enzima HBDH (10 μ l = 30 mU) y el tiempo óptimo de reacción fue de 25 min.

La solución stock de acetoacetato fue valorada en una mezcla de reacción constituida por buffer fosfato 50 mM pH 7.0 y NADH 100 μ M, ambos contenidos en un volumen final de 1.0 ml. La DO_1 se leyó después de la adición de acetoacetato (50 μ l = 50 nmol). Posterior a la incorporación de la enzima HBDH (10 μ l = 50 mU) y transcurridos 25 min de reacción se tomó la DO_2 .

Resultados y Discusión

La oxidación de NADH en presencia de HBDH y concentraciones crecientes de acetoacetato procedió de forma estequiométrica (Fig. 6). La cantidad de NADH oxidado, medida como un decremento en fluorescencia, resultó directamente proporcional a la cantidad de acetoacetato presente en una amplitud de 0.2 a 1.8 μ M por volumen de reactivo analítico (Fig. 6).

La precisión del método fue de 76.21 ± 4.52 (M \pm ES) - - N=5 y un C.V. de 9.2%. La reproducibilidad resultó de 77.34 ± 3.26 (M \pm ES), N=4 y un C.V. de 7.4% (Tablas 1,2,3). Una misma concentración de acetoacetato valorada en un sistema de ensayo idéntico y en ocasiones diferentes dió lecturas de fluorescencia similares cada vez. Experimentos de recuperación de cantidades conocidas de acetoacetato incorporadas a plasma, inclusive en presencia de otros sustratos, dió 97.5 ± 1.93 (M \pm ES), N=3 (Tablas 1,2,3). Aproximadamente, las determinaciones de acetoacetato por esta técnica son exactas en un 98%. Estas determinaciones establecieron la especificidad del ensayo enzimático (Tablas 1,2,3).

Los valores de acetoacetato en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de (μ M) 52.81 ± 6.32 (M \pm ES), N=12 y de 58.26 ± 6.72 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

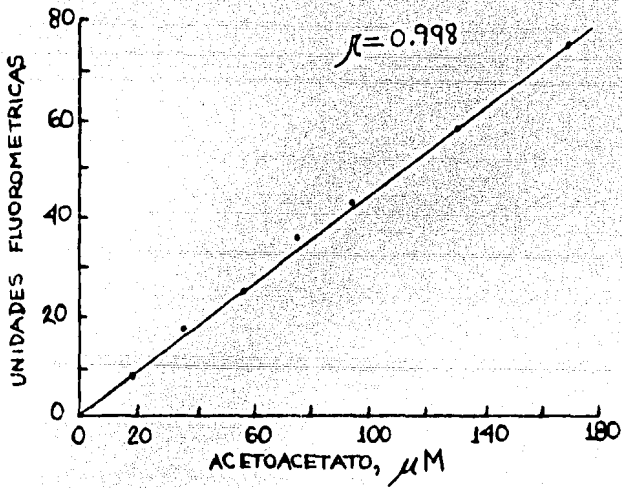


Fig. 6. Concentración de acetoacetato vs. lectura fluorométrica neta para una concentración de $6 \mu\text{M}$ de NADH en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

3.7. Procedimiento analítico para la determinación de citrato.

Método de Lowry, O.H. y Passonneau, J.V. (99)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer tris-HCl 200 mM pH 7.6
2. Nicotinamida-adenina dinucleótido reducido (NADH) 5mM en buffer carbonato 100 mM pH 10.6
3. Citrato liasa (CL) suspensión en buffer imidazol-HCl 50 mM pH 7.4 conteniendo ZnCl_2 300 μM
4. Malato deshidrogenasa (MDH) stock original diluido con buffer tris-HCl 100 mM pH 8.0
5. Solución stock de ácido cítrico 100 mM (Baker Analyzed).
6. Cloruro de zinc 1 mM (Baker Analyzed)

(') De Sigma Ch. Co. St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estándar fue experimentada con alícuotas (10 μl) de cada una de las soluciones estándar puras (25, 50, 75, 100,

125, 150, 175 y 200 μ M) de citrato. Correspondió a ésta una amplitud límite de 0.25 a 2.0 nmol de citrato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). Se emplearon fracciones (10-20 μ l) de los extractos neutros de muestras para su valoración.

En cada serie de estimaciones se analizaron, en forma concomitante, los estándares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer tris-HCl 50 mM pH 7.6, NADH 5 μ M, ZnCl₂ 40 μ M y MDH 0.3 U, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. El fluorómetro fue ajustado a sensibilidad 30X e incluso el filtro neutro 10%. La lectura inicial (UF₁) se efectuó después de la adición, en forma conveniente, del problema. Una alícuota de 10 μ l (15 mU) de CL fue adicionada. La lectura final (UF₂) se tomó a los 15 min de reacción.

La solución stock de citrato fue valorada en una mezcla de reacción compuesta por buffer tris-HCl 100 mM pH 7.6, NADH 50 μ M, ZnCl₂ 40 μ M y MDH 0.3 U, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. La DO₁ se tomó después de haber transferido el citrato (25 μ l = 50 nmol) a la mezcla de reacción. La enzima CL (30 μ l = 80 mU) fue adicionada. La DO₂ se leyó a los 10 min de reacción.

Resultados y Discusión

El sistema de ensayo se fundamentó en la ruptura de citrato en oxalacetato y acetato por la actividad de CL y la medición del oxalacetato formado por la oxidación acoplada de NADH en pre

sencia de MDH. Este mecanismo de reacción acoplada procedió de forma cuantitativa en una amplitud límite de 0.25 a 2.0 nmol de citrato por volumen de mezcla analítica. La cantidad de NADH oxidado y medida por el decremento en fluorescencia resultó equivalente a la cantidad de citrato presente (Fig. 7).

La precisión del método (μM) fue de 104.31 ± 2.21 ($M \pm ES$), $N=5$ y un C.V. de 4.7%. La variabilidad inter-ensayos resultó de 100.71 ± 3.67 ($M \pm ES$), $N=4$ y un C.V. de 5.2%. En condiciones idénticas de ensayo, una misma muestra valorada en ocasiones diferentes dió resultados reproducibles (Tablas 1,2,3). La frecuente congelación y descongelación de los extractos neutros no alteró la estabilidad de citrato en las muestras. Ensayos de recuperación de cantidades conocidas de citrato adicionadas a plasma, inclusive en presencia de otros sustratos, dieron un porcentaje de $98.93 \pm 2.1\%$ ($M \pm ES$), $N=3$ (Tablas 1,2,3). Los datos obtenidos establecieron la exactitud y la especificidad de la técnica enzimática.

Los valores de citrato (μM) en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de 95.47 ± 6.97 ($M \pm ES$), $N=12$ y de 119.37 ± 6.5 ($M \pm ES$), $N=15$, respectivamente.

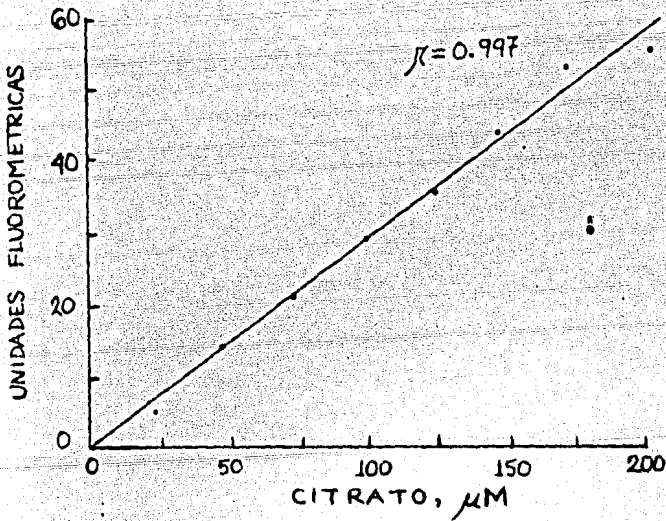


Fig. 7. Concentración de citrato vs. lectura fluorométrica neta para una concentración de $5 \mu\text{M}$ de NADH en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

3.8. Procedimiento analítico para la determinación de α -cetoglutarato.

Método de Lowry, O.H., y Passonneau, J.V. (99)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer imidazol-acetato 80 mM pH 6.9
2. Adenosina-5'- difosfato (ADP) 10 mM pH 7.0
3. Nicotinamida-adenina dinucleótido reducido (NADH) 5mM en buffer carbonato 100 mM pH 10.6
4. Glutamato deshidrogenasa (GLDH) suspensión original diluida con buffer tris-HCl 20 mM pH 8.1 conteniendo ADP 100 μ M
5. Solución stock de ácido α -cetoglutarico 100 mM ajustada a pH 8.0
6. Acetato de amonio 100 mM (Baker Analyzed)

(') Preparaciones comerciales de Sigma Ch. Co. St. Louis

MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue experimentada con alícuotas (50 μ l) de cada uno de los extractos neutros de las soluciones estandar (5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M) de α -cetoglutarato. Correspondía

a ésta una amplitud límite de 0.1 a 1.0 nmol de α -cetoglutarato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). De forma alternativa, otra curva estandar de mayor sensibilidad fue ensayada con fracciones (50 μ l) de cada una de las soluciones estandar puras (1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 μ M) de α -cetoglutarato. Exhibió éstas concentraciones límites de 0.062 a 0.625 nmol de α -cetoglutarato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). Alícuotas de 50 μ l de los extractos neutros de las muestras fueron valoradas.

En cada serie de estimaciones se ensayaron, en forma simultánea, los estándares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer imidazol-acetato 40 mM pH 6.9, acetato de amonio 25 mM, ADP 100 μ M y NADH 1.5 μ M, todo esto contenido en volumen final de 1.0 ml. El fluorómetro se ajustó a sensibilidad 3X. La lectura inicial (UF_1) se efectuó después de la adición, en forma adecuada, del problema. Se incorporó la enzima GLDH (30 μ l = 1.2 U). La lectura final se tomó a los 20 min de reacción (UF_2). La curva estandar en niveles límites de 0.062 a 0.625 nmol de α -cetoglutarato por tubo analítico, se ensayó en un sistema de reacción similar al descrito arriba, excepto que la concentración del nucleótido fue disminuída a 0.75 μ M. Las lecturas fueron hechas a sensibilidad 10X.

La solución stock de α -cetoglutarato fue valorada en una mezcla de reacción compuesta por buffer imidazol-acetato 40 mM pH 6.9, acetato de amonio 25 mM, ADP 100 μ M y NADH 100 μ M, todo

esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. La lectura inicial (DO_1) se tomó después de la adición de α -cetoglutarato ($10 \mu\text{l} = 50 \text{ nmol}$). La lectura final se leyó (DO_2) después de incorporar la enzima GLDH ($10 \mu\text{l} = 0.2 \text{ U}$) y transcurridos 10 min. de reacción.

Resultados y Discusión

Conforme al principio de reacción estequiométrica en el sistema de ensayo, la cantidad de NADH oxidada y medida por el decremento en fluorescencia resultó equivalente a la cantidad de α -cetoglutarato presente. Esta proporcionalidad directa fue consistente cuando el α -cetoglutarato fue medido en una amplitud de 0.1 a $1.0 \mu\text{M}$ y de 0.062 a $0.625 \mu\text{M}$ por volumen de reactivo analítico (Fig. 8). La sensibilidad del ensayo fue dada por la cantidad del NADH presente en la reacción, la cual determinó el ajuste de sensibilidad del fluorómetro.

La precisión del método (μM) fue de $8.41 \pm 0.41 (M \pm ES)$, $N = 5$. La variabilidad inter-ensayos resultó de $8.31 \pm 0.29 (M \pm ES)$, $N=4$ (Tablas 1,2,3). En condiciones idénticas de ensayo, una misma concentración de α -cetoglutarato valorada en ocasiones diferentes, dió resultados reproducibles cada vez. La frecuente congelación y descongelación de las muestras no afectó la estabilidad del α -cetoglutarato presente. La recuperación de cantidades conocidas de α -cetoglutarato adicionadas a plasma, inclusive en la presencia de otros sustratos, resultó del 100%. La técnica dió una exactitud en las mediciones de

101.6 \pm 1.4 (M \pm ES), N=3 (Tablas 1,2,3). Los datos obtenidos establecieron la exactitud y la especificidad de la técnica enzimática.

Los valores de α -cetoglutarato (μ M) en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de 11.5 \pm 0.5 (M \pm ES), N=12 y de - - 8.65 \pm 0.57 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

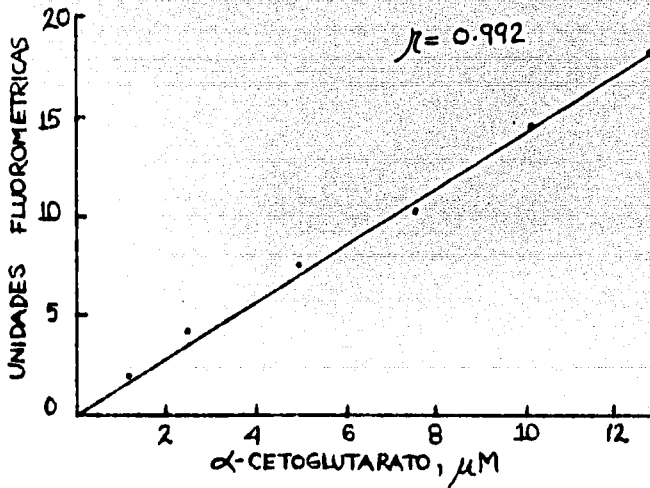


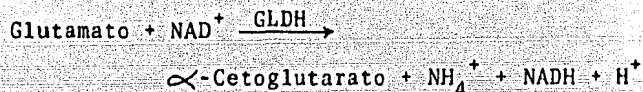
Fig. 8. Concentración de α -cetoglutarato vs. lectura fluorométrica neta para una concentración de 0.75μ M de NADH en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación..

3.9 Procedimiento analítico para la determinación de glutamato.

Método de Lowry, O.H., y Passonneau, J.V. (99)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer tris-acetato 100 mM pH 8.4
2. Adenosina-5'-difosfato (ADP) 10 mM pH 7.0
3. Nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) 100 mM
4. Glutamato deshidrogenasa (GLDH) libre de iones NH_4^+ y glutamasa. Stock original (solución en glicerol al 50%) diluido con buffer tris-acetato 25 mM pH 8.4.
5. Solución stock de ácido glutámico 100 mM ajustada a pH de 9.8 (Calbiochem)

(') Adquiridos de Sigma Ch. Co. St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue experimentada con alicuotas ($20 \mu\text{l}$) de cada uno de los extractos neutros de las soluciones estandar (20, 60, 100, 140, 180, 220, 260, y $300 \mu\text{M}$) de glutamato. Representó niveles límites de 0.1 a 2.6 nmol de glutamato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). De forma alternativa, --

otra curva estandar fue ensayada con fracciones ($10\ \mu\text{l}$) de cada una de las soluciones estandar puras (20, 60, 100, 140, 180, 220, 260 y $300\ \mu\text{M}$) de glutamato. Exhibía ésta límites de 0.2 a 6.0 nmol de glutamato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). Alicuotas de $10\text{-}20\ \mu\text{l}$ de los extractos neutros de muestras fueron valoradas.

En cada serie de estimaciones se ensayaron, en forma simultánea, los estándares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer tris-acetato 50 mM pH 8.4, NAD $400\ \mu\text{M}$ y ADP $100\ \mu\text{M}$, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. El fluorómetro fue ajustado a sensibilidad 3X. La lectura inicial (UF_1) se efectuó después de la adición, en forma conveniente, del problema. Se incorporó la enzima ($10\ \mu\text{l} = 2.25\ \text{U}$). La lectura final (UF_2) se tomó a los 20 min de reacción.

La solución stock de glutamato fue valorada en una mezcla de reacción compuesta por buffer tris-acetato 50 mM pH 8.4, NAD 1 mM, ADP $100\ \mu\text{M}$ y H_2O_2 10 mM, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. La lectura inicial (DO_1) se tomó después de la adición de glutamato ($10\ \mu\text{l}$ equivalente a 100 nmol). La lectura final (DO_2) se efectuó después de incorporar la enzima - - GLDH ($20\ \mu\text{l} = 4.5\ \text{U}$) y transcurridos 20 min de reacción.

Resultados y Discusión

La reducción de NAD^+ en presencia de GLDH y concentraciones crecientes de glutamato procedió de forma estequiométrica

en el sistema de ensayo. La cantidad de NADH producido, detectada como un aumento en fluorescencia, fue directamente proporcional a la cantidad de glutamato presente. Esta relación fue consistente cuando el glutamato fue medido en niveles límites - de 0.1 a 2.6 μM y de 0.2 a 6.0 μM por volumen de reactivo analítico (Fig. 9).

La precisión de método (μM) fue de 108.78 ± 2.03 (M \pm ES), N=5 y un C.V. de 4.2%. La reproducibilidad resultó de 110.56 ± 2.43 (M \pm ES), N=4 y un C.V. de 4.4% (Tablas 1,2,3). Una misma concentración de glutamato valorada en un sistema de ensayo idéntico y en ocasiones diferentes dió lecturas de fluorescencia similares cada vez. La recuperación de cantidades conocidas de glutamato incorporado de plasma, inclusive en presencia - de otros sustratos, dió $101.3 \pm 2.9\%$ (M \pm ES), N=3 (Tablas 1,2,3).

Los valores de glutamato (μM) en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de 70.82 ± 7.12 (M \pm ES), N=12 y de 76.37 ± 6.11 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

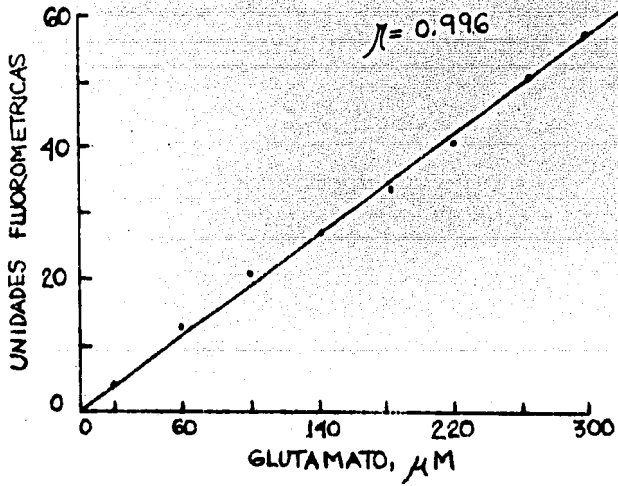


Fig. 9. Concentración de glutamato vs. lectura - fluorométrica neta para una concentración de $400 \mu\text{M}$ de NAD en el sistema de ensayo.

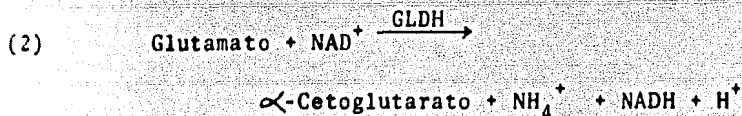
r = Coeficiente de correlación.

3.10. Procedimiento analítico para la determinación de glutamina.

(1) Método de Patricia Lund (100)

(2) Método de Lowry, O.H., y Passonneau, J.V. (99).

Principio



Reactivos (')

1. Buffer acetato 500 mM pH 5.0
2. Glutaminasa, solución en buffer acetato 50 mM pH 5.0
3. Solución stock de glutamina 100 mM
4. Hidroxilamina 20 mM
5. Soluciones reactivas para la determinación enzimática de glutamato (ver p.211)

(') De Sigma Ch. Co. St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue experimentada con alícuotas (50 μ l) de cada una de las soluciones estandar puras (200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 μ M) de glutamina. Estas fracciones -

fueron sometidas a hidrólisis enzimática por glutaminasa. La curva estándar correspondía a una amplitud límite de 10 a 50 nmol de glutamina por volumen de reactivo analítico de hidrólisis (1.0 ml). Aliquotas ($100\ \mu\text{l}$) de los extractos neutros de muestras fueron ensayados para hidrólisis enzimática.

En cada serie de estimaciones se ensayaron, en forma simultánea, los estándares, muestras y blancos. La mezcla de hidrólisis enzimática consistió en buffer acetato 200 mM pH 5.0, hidroxilamina 2 mM y glutaminasa 32 mU, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. Una vez que se adicionó el problema, en forma adecuada, los tubos de reacción se incubaron a 37° por 1 h.

La fase siguiente del método consistió en el ensayo de aliquotas de los hidrolizados, en forma conveniente, para valorar por fluorometría el contenido de glutamato (Ver "Procedimiento analítico para la determinación de glutamato" p.211). La curva estándar fue experimentada con aliquotas ($50\ \mu\text{l}$) de cada uno de los hidrolizados de estándar. Representó ésta una amplitud límite de 0.5 a 2.5 nmol de glutamato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). Una fracción ($25\text{-}100\ \mu\text{l}$) de los hidrolizados de muestras fue empleada para cuantificar glutamato. Una alícuota ($10\text{-}20\ \mu\text{l}$) de los extractos neutros de muestras no sometida a hidrólisis fue analizada para determinar glutamato (Ver "Procedimiento analítico para la determinación de glutamato" p.211). La concentración de glutamina en las muestras se calculó por diferencia entre el contenido de glutamato

total (después de hidrólisis) y el glutamato presente en los extractos neutros no hidrolizados.

Resultados y Discusión

El sistema de ensayo se fundamentó en la hidrólisis de glutamina a glutamato y amoníaco por la actividad de la glutaminasa, seguida por la medición del glutamato formado por reducción de NAD en presencia de GLDH. El cambio en concentración de NAD, detectado como un incremento en fluorescencia, en presencia de GLDH y concentraciones crecientes de glutamato procedió de forma cuantitativa reflejando la estequiometría de la hidrólisis enzimática por glutaminasa. La cantidad de NAD reducido fue equivalente a la cantidad de glutamina presente en niveles límites de 0.5 a 2.5 μ M por volumen de reactivo analítico (Fig. 10).

La precisión del método (μ M) fue de 445.93 ± 8.49 (M \pm ES), N=5 y un C.V. de 5.6%. La variabilidad inter-ensayos resultó de 442.74 ± 9.09 (M \pm ES), N=4 y un C.V. de 6.1% (Tablas 1,2,3). En condiciones idénticas de ensayo una misma concentración de glutamina valorada en ocasiones distintas dió resultados reproducibles cada vez. La frecuente congelación y descongelación de los extractos neutros de muestras no alteró la estabilidad de la glutamina presente. Los ensayos de recuperación de cantidades conocidas de glutamina adicionada a plasma, inclusive en presencia de otros sustratos, resultaron de $104.2 \pm 3.8\%$ (M \pm ES), N=3 (Tablas 1,2,3). La técnica dió una

exactitud en las mediciones de casi el 100%. Los datos aluden a la especificidad inherente del método enzimático vía glutamina sa y GLDH.

Los valores de glutamina (μ M) en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de 493.18 ± 26.46 (M \pm ES) N=12 y de 476.76 ± 18.58 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

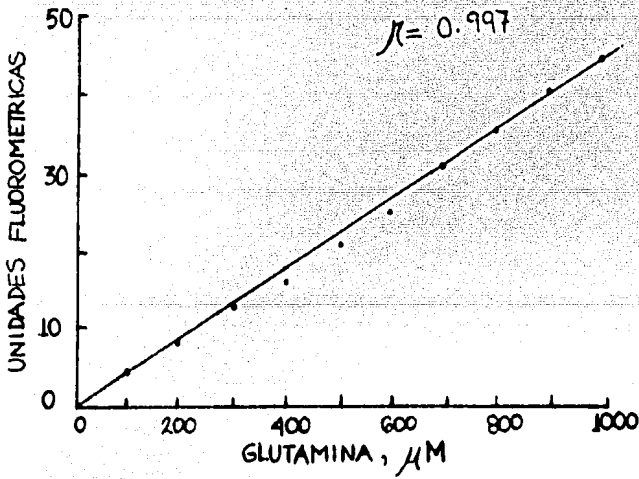


Fig. 10. Concentración de glutamina vs. lectura fluorométrica neta para una concentración de $400\ \mu\text{M}$ de NAD en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

3.11. Procedimiento analítico para la determinación de aspartato.

Método de Lowry, O.H. y Passonneau, J.V. (99)

Principio



Reactivos (')

1. Buffer imidazol-HCl 100 mM pH 7.0
2. Nicotinamida-adenina dinucleótido reducido (NADH) 5 mM en buffer carbonato 100 mM pH 10.6
3. Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) stock original -- diluido con buffer imidazol-HCl 20 mM pH 7.0
4. Malato deshidrogenasa (MDH) suspensión original diluida con buffer imidazol-HCl 20 mM pH 7.0
5. Solución stock de ácido α -cetoglutarico 100 mM ajustada a pH 8.0
6. Solución stock de aspartato (ácido aspártico) 100 mM - - (Calbiochem)

(') De Sigma Ch. Co. St. Louis MO. Otros reactivos usados eran también de grado analítico.

Metodología

La curva estandar fue experimentada con alicuotas ($20\ \mu\text{l}$) de cada una de las soluciones estandar puras (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y $80\ \mu\text{M}$) de aspartato. Exhibía niveles límites de 0.2 a 1.6 nmol de aspartato por volumen de reactivo analítico (1.0 ml). Fracciones (10- $20\ \mu\text{l}$) de los extractos neutros de las muestras fueron empleados para la valoración.

En cada serie de estimaciones, se analizaron en forma comitante, los estandares, muestras y blancos. La mezcla de reacción consistió en buffer imidazol-HCl 50 mM pH 7.0, NADH $2.0\ \mu\text{M}$, α -cetoglutarato $50\ \mu\text{M}$ y MDH 0.35 U, todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. El fluorómetro se ajustó a sensibilidad 3X. La lectura inicial fue hecha después de que se adicionó, en forma adecuada, el problema. Se incorporó la enzima GOT ($20\ \mu\text{l} = 1.8\ \text{U}$) y la lectura final (UF_2) fue leída a los 10 min de reacción.

La solución stock de aspartato fue valorada en una mezcla analítica que consistió en buffer imidazol-HCl 50 mM pH 7.0, -- NADH $100\ \mu\text{M}$, α -cetoglutarato $200\ \mu\text{M}$, GOT 1.8 U y MDH 1.4 U, -- todo esto contenido en un volumen final de 1.0 ml. La lectura inicial (DO_1) se tomó antes de la adición del aspartato ($10\ \mu\text{l} = 100\ \text{nmol}$). La lectura final (DO_2) se leyó a los 10 min de reacción.

Resultados y Discusión

El sistema de ensayo se fundamentó en la conversión de aspartato a oxalacetato por GOT y la medición del oxalacetato formado por la reducción acoplada de NADH en presencia de MDH. Este mecanismo de reacción acoplada procedió de forma cuantitativa en una amplitud límite de 0.2 a 1.6 μM por volumen de reactivo analítico. La cantidad de NADH oxidado y medida por el decremento en fluorescencia resultó equivalente a la cantidad de aspartato presente (Fig. 11). La sensibilidad del ensayo fue dada por la cantidad del NADH (2.0 μM) presente en la reacción, la cual determinó el ajuste de sensibilidad del fluorómetro.

La precisión del método (μM) fue de 44.04 ± 1.68 (M \pm ES), N=5 y un C.V. de 5.2%. La variabilidad interensayos resultó de 43.63 ± 1.21 (M \pm ES), N=4 y un C.V. de 5.5%. Una misma concentración de aspartato valorada en un sistema de ensayo idéntico y en ocasiones diferentes dió resultados reproducibles cada vez (Tablas 1,2,3). La recuperación de cantidades conocidas de aspartato adicionadas a plasma, inclusive en presencia de otros sustratos, resultó cuantitativa $97.9 \pm 2.5\%$ (M \pm ES), N=3 (Tablas 1,2,3). Los datos indican que no ocurrieron reacciones inespecíficas.

Los valores de aspartato (μM) en plasma de niños y adultos normales mexicanos, en condiciones de ayuno durante toda la noche, resultaron de 17.24 ± 1.95 (M \pm ES), N=12 y de 34.43 ± 3.12 (M \pm ES), N=15, respectivamente.

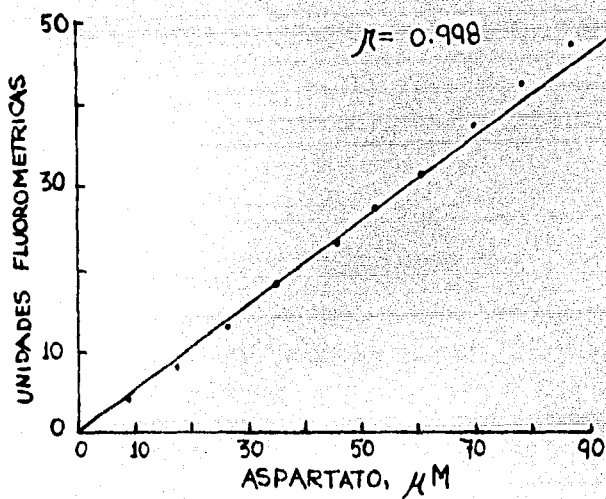


Fig. 11. Concentración de aspartato vs. lectura - fluorométrica neta para una concentración de $2\mu\text{M}$ de NADH en el sistema de ensayo.

r = Coeficiente de correlación.

C A P I T U L O VI

ESTUDIO DEL PERFIL METABOLICO DINAMICO DE UNA PACIENTE
(SML) CON ACIDOSIS LACTICO-PIRUVICA DEBIDA A DEFICIENCIA
DE LAS CARBOXILASAS DE PIRUVATO, PROPIONIL-CoA Y
 β -METILCROTONIL-CoA.

1. CASO CLINICO

Paciente del sexo femenino y edad de 5 años 7 meses, mexicana. Producto de madre de 36 años grávida 6, para 4, abortos espontáneos 2. Embarazo de 40 semanas y amenaza de aborto al tercer mes de gestación, tratado con medicamentos. La madre notó movimientos fetales tardíos y débiles. Parto prolongado y eutócico, con uso de fórceps. Apnea neonatal y cianosis. Peso al nacimiento 3.200 Kg. No había consanguinidad entre los padres. Desde el nacimiento la niña pasaba la mayor parte del tiempo dormida. A los tres meses de edad la paciente desarrolló espasmos masivos y crisis convulsivas tipo tónico con frecuencias de varios episodios al día. A los 4 meses se le diagnosticó retraso psicomotor profundo con un desarrollo actual correspondiente a sólo 1-2 meses de vida. A la edad de 1 año 8 meses fue admitida por primera vez en la Clínica de Errores Innatos del Metabolismo del Instituto Nacional de Pediatría DIF. El examen físico reveló talla por debajo de la tercera percentila, microcefalia y retraso mental profundo. Nistagmus con pobre respuesta pupilar y ceguera. Incoordinación del mecanismo de deglución y secreciones abundantes traqueo-bronquiales continuas que requerían ser aspiradas. Tetraparesia espástica, reflejos aumentados y pies en equinovalgo. No presentaba organomegalia. Ausencia de piezas dentarias. La paciente se mostró indiferente al medio, respondía a estímulos dolorosos o fuertes y no reconocía a sus padres. Datos iniciales de laboratorio revelaron anemia hipocrómica y resultaron normales la química sanguínea, el examen general de orina y las pruebas de --

funcionamiento hepático. Estudios en electrolitos séricos mostraron bicarbonato consistentemente bajo (13 meq/l; N:17-25 meq/l y brecha de aniones ("anion gap") por arriba de lo normal (20.8 meq/l; N:8-16 meq/l). El pH urinario en varias ocasiones era inferior a 6.0. Las gasometrías presentaban resultados variables con pH normal (7.35 a 7.45) o alcalino (hasta 7.61), pCO_2 y pO_2 eran normales (28-35 y 60-80, respectivamente) o tenían valores bajos (15 y 40, respectivamente). Los niveles sanguíneos de piruvato (284 M; N:54-244 μ M) y de lactato (3.2 mM; N: 0.55-2.2 mM) se encontraron por arriba de lo normal. La alanina en plasma se detectó elevada (1,009 mM; N:140-300 mM). En orina se observó ligera hiperaminoaciduria generalizada con aumento de alanina y con moderados incrementos de glicina, serina y tirosina. La cromatografía gas líquida en muestras de orina extraídas con etil acetato y derivatizadas con N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) reveló que la excreción de los ácidos orgánicos urinarios (no volátiles) era normal con excepción de lactato. Los α -cetoácidos piruvato y α -cetoglutarato en orina se encontraban también elevados. El electroencefalograma mostró severa alteración paroxística con descarga de complejos de espigas, ondas de alto voltaje que se agrupan en trenes y afectan todas las derivaciones con franco predominio del hemisferio izquierdo. Una tomografía axial computarizada reveló atrofia cortical y subcortical importante. En este período se inició terapia de anticonvulsivantes (difenilhidantoína, nitrazepam y clonazepam) y se logró disminuir la intensidad y frecuencia de las convulsiones.

2. MATERIAL Y METODOS

Todos los estudios de investigación para caracterizar el fenotipo bioquímico-clínico de la paciente, fueron realizados en la Clínica de Errores Innatos del Metabolismo del Instituto Nacional de Pediatría DIF. Las muestras biológicas (sangre o plasma) se obtuvieron de venodisección yugular externa. La sangre fue colectada cuando fluía libremente a través del catéter venoso que se mantuvo permeable con el goteo lento de solución salina fisiológica conteniendo heparina (1 U/ml). Inmediatamente la muestra se adicionó a un volumen igual (relación 1:1) de una solución fría de HClO_4 1M. Después de mezclado se centrifugó a 0°C por 10 min y 3,600 rpm. La fracción sobrenadante se conservó a -20°C hasta su utilización. Esta fue neutralizada, pH 6.8-7.2, con una solución fría de KHCO_3 3M (ver "Preparación del extracto neutro de plasma" p.168). El extracto neutro de sangre o plasma sirvió para la medición por procedimientos enzimáticos-fluorométricos de α -cetoglutarato, citrato, glucosa, lactato, piruvato, alanina, β -hidroxibutirato, acetoacetato, glutamato, glutamina y aspartato.

La paciente recibió megadosis oral de tiamina (300 mg/d) administrada como monofosfato de benzoil tiamina (Roussel) a una concentración de 200 mg/ml. La biotina (Norwich) prescrita en dosis farmacológicas (10 mg/d) se empleó a una concentración de 5 mg/ml disuelta en azúcar y agua (1:1). La mezcla de ácidos aspártico y glutámico (Ajinomoto) fue administrada en una única dosis diaria (50 mg por Kg de peso corporal) espolvoreada sobre la comi

da. La paciente recibía un aporte calórico normal de 1,300 Kcal --(Carbohidratos) 50% : (Grasas) 35% : (Proteínas) 15%--.. La prueba se efectuó después de un ayuno de 12 horas; en un caso con impregnación de biotina y en otro en ausencia de este cofactor. Las respuestas metabólicas de sobrecargas con glucosa oral (9.7 mmol/kg de peso corporal) y con alanina I.V. (1.1 mmol/kg de peso corporal) se practicaron siguiendo a un ayuno de 11 y 17 horas, respectivamente. Las pruebas de tolerancia de alanina I.V. (1.1 mmol/kg) y de glucosa (9.7 mmol/kg) I.V. se aplicaron concomitantes a la administración de biotina (15 mg/d) y después de ayuno de 11 y 12 horas, respectivamente. La biotina se dió por 20 días antes de la prueba y en el transcurso de ésta. La alanina (Sigma) fue disuelta al 10% en solución salina fisiológica y esterilizada por filtración por membrana. La glucosa, tanto en forma oral como I.V., se dió como solución al 50% en agua (Dextra--bbott). En los tres estudios experimentales de cetosis a los que la paciente fue expuesta, la fórmula cetogénica prescrita -- fue calculada en base a las tablas de equivalentes calóricos proporcionadas por el Instituto Nacional de Nutrición INN. En dos de ellos, la dieta rica en grasas de 1,200 Kcal/d --(Grasas) 65% (Carbohidratos) 20% : (Proteínas) 15%-- se suplementó con triglicéridos de cadena media (preparación comercial de Mead Johnson) para incrementar el aporte calórico por grasas. En el otro estudio, la terapia cetogénica con una distribución calórica total de 1,200 - 1,300 Kcal/d --(Grasas)65-80% : (Carbohidratos)15-20% : (Proteínas)10-15%-- fue complementada con aceite de coco -- que tiene una composición importante de triglicéridos de cadena -

media (60%) y es de fácil adquisición en nuestro medio. En todos los casos la terapia con dieta cetónica se inició siguiendo a un ayuno mayor de 48 horas, cuando la paciente había perdido el 8-10% de su peso corporal y presentaba cuadro cetósico (cetonuria persistente). La fórmula cetónica fue administrada (vía sonda nasogástrica) en forma gradual, en cuanto aporte calórico provisto por grasas por día, aplicándose 1/3 de la dieta el primer día, 2/3 el segundo día y la dieta completa el tercer día. La paciente tenía un control adecuado de sus crisis convulsivas pues recibía tratamiento con anticonvulsivante. Se observó cuidadosamente el manejo de las condiciones clínicas de la paciente y se valoraron los efectos metabólicos y respuestas bioquímicas a las dietas aplicadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSION DE EXPERIMENTOS IN VIVO

3.1 Terapia con megadosis oral de tiamina.

Debido a que una deficiencia en la enzima piruvato deshidrogenasa (PDHC) fue inicialmente considerada se administraron dosis farmacológicas (300 mg/d) de tiamina. No ocurrió mejoría bioquímica ni clínica. El piruvato (130-345; (N) 34.08-113.6 μM) y el lactato (1.5-3.0; (N) 0.55-1.8 mM) en sangre se mantuvieron por arriba de los límites normales. La terapia con dosis farmacológicas (esto es, muy superiores a las recomendadas nutricionalmente) de tiamina se justifica por ser ésta el cofactor del complejo PDHC. Es posible que a la concentración normal de tiamina presente en los tejidos ocurra una inadecuada afinidad de la PDH mutante por el pirofosfato de tiamina (TPP); así, el suministro de dosis elevadas de tiamina proveerá un aumento en la saturación con TPP e incrementará de esta forma la actividad del complejo PDHC. Además el TPP inhibe a la cinasa reguladora que fosforila (inactiva) a la enzima PDHC. (16, 18, 19, 97).

3.2 Terapia con megadosis oral de biotina

En un estudio posterior se analizaron las respuestas bioquímicas a terapia con megadosis (10 mg/d) de biotina, cofactor de la piruvato carboxilasa (PC). La terapia se aplicó por 7 semanas concomitante con un suplemento de ácido aspártico (100 mg/kg d) y de ácido glutámico (200 mg/kg/d) con objeto de proveer sustratos adicionales al ciclo de Krebs a través de vías alternas, diferentes a la anaplerosis por PC, que no estuviesen bloqueadas.

La mezcla de aminoácidos se dió en combinación con piridoxina (100 mg/d) para asegurar una adecuada velocidad de transaminación. El piruvato en sangre (120-130 μ M) disminuyó de forma significativa, pero permaneció arriba del nivel normal y se elevó (hasta 190 μ M) al suprimir la terapia. El lactato descendió (1.3-1.8 mM) a límites normales. En una segunda ocasión esta terapia se aplicó por 8 semanas y el piruvato no se modificó en forma importante. En otro periodo en que SML estuvo hospitalizada, el tratamiento con biotina (15 mg/d) provocó reducción de piruvato (104 μ M) y de lactato (1.77 mM) a límites normales. En este periodo no se dió suplemento de aminoácidos. La paciente respondió favorablemente a la administración de megadosis de biotina (dosis más de 1,000 veces mayor que la consumida en una dieta normal). Se observó mejoría bioquímica (normalización del lactato y del piruvato sanguíneos) y corrección de la deficiencia enzimática (aumento de la actividad de PC). Este efecto terapéutico fue demostrado también en fibroblastos en cultivo, derivados de la niña (Vellázquez, A. y cols. Trabajo sometido a Publicación). En virtud del daño neurológico severo de la paciente no puede percibirse en qué medida los cambios bioquímicos inducidos por la biotina contribuyen a soportar un beneficio clínico observable. Sin embargo, puede apreciarse una ligera mejoría clínica durante cada episodio de administración de biotina consistente en menor indiferencia al medio y mejor tono muscular. En base a la respuesta a biotina se hizo el diagnóstico de deficiencia múltiple de carboxilasas el cual fue confirmado al demostrar una actividad baja de las carboxilasas de piruvato (PC), de propionil-CoA (PCC) y de β -metilcro-

tonil-CoA (β -MCC) en linfocitos de sangre periférica y en fibroblastos en cultivo derivados de la paciente (Velázquez, A. y cols. Trabajo sometido a publicación). La terapia con megadosis de biotina, cofactor de las carboxilasas deficientes -PC, PCC y β -MCC, reactiva a la enzima mutante superando de esta forma el bloqueo metabólico. Este error metabólico es un ejemplo de los trastornos conocidos como "Dependencias vitamínicas hereditarias". El defecto metabólico primario en esta paciente radica en la deficiencia en la sintetasa de holocarboxilasas (González-Noriega, A.; -- Ortiz, R. y Velázquez, A. Manuscrito en preparación). Como otros autores proponen (37, 235), gran parte del deterioro neurológico prominente que exhibe la niña se debe presumiblemente a privación importante del metabolismo energético cerebral. La deficiencia en PC compromete la función anaplerótica limitando el flujo de metabolitos a través del ciclo de Krebs. La prescripción de dosis terapéuticas de aspartato y glutamato pretende incrementar la poza de intermediarios del ciclo de Krebs, incorporándose al ciclo por vías alternas a la PC. En la tabla 8 se observa la reducción importante de los niveles sanguíneos del lactato, piruvato y alanina después de la terapia con dosis farmacológicas del cofactor. Los cuerpos cetónicos experimentan una disminución notoria.

3.3 Estudio de tolerancia de glucosa oral.

La niña (edad de 2 años 6 meses) fue sometida a estudios de tolerancia de glucosa oral e I.V. y de alanina I.V. Para evidenciar un bloqueo en el metabolismo oxidativo del piruvato se --

NIVELES BASALES DE METABOLITOS EN SANGRE DE SML (μ M)

Metabolito	M \pm S		M \pm S		Reportados	Referencias
	Sin biotina ¹		Con biotina ²			
α -Cetoglutarato	4.95 \pm	1.17	12.85 \pm	0.86	8.49 \pm 0.53	(103)
Citrato	33.92 \pm	3.73	76.88 \pm	11.64	68.0 - 88.0	(37,43,98)
Glucosa (')	3.95 \pm	0.41	4.6 \pm	0.12	4.16 - 5.27	(98)
Lactato (')	3.73 \pm	0.16	2.07 \pm	0.20	0.55 - 1.33	(43,61,155)
Piruvato	403.53 \pm	27.13	162.44 \pm	33.05	81.0 - 85.0	(30,43,182)
Alanina	739.20 \pm	156.33	370.81 \pm	40.68	140.0 - 300.0	(4,155,233)
β -Hidroxitirato	320.08 \pm	95.53	274.78 \pm	33.87	58.0 - 170.0	(98,237)
Acetoacetato	121.18 \pm	27.54	69.60 \pm	11.7	18.0 - 78.0	(116,182)
Glutamato	159.03 \pm	35.0	144.18 \pm	30.06	91.0 \pm 20.0	(71)
Glutamina	665.89 \pm	31.08	608.02 \pm	57.98	150.0 - 900.0	(71,155)
Aspartato	8.17 \pm	0.86	15.49 \pm	1.48	16.9 \pm 3.5	(71)
L/P	9.38 \pm	0.99	13.67 \pm	2.33	10.0 - 15.0	(30,155)
Ala/Pir	1.86 \pm	0.45	2.46 \pm	0.47	1.0 - 2.0	(155)
β -HB/AcAc	2.56 \pm	0.43	4.01 \pm	0.19	2.0 - 4.0	(155,182)

(') μ Mx10³

(1) N=3, valores basales después de ayuno de 12 y 17 hrs.

(2) N=3, después de ayuno de 11 y 12 hrs.

Tabla 8

dió una carga oral de glucosa (9.7 mmol/kg de peso corporal). La glucosa sanguínea (4.5-11.5; (N) 4.16-5.27 mM) ascendió y luego se redujo (7.6 mM) siguiendo un comportamiento normal. Los niveles basales anormales de piruvato (300 → 500 μ M) y lactato (2.8 → 4.2 mM) se incrementaron en forma importante y gradual. Ocurrió un aumento significativo de β -hidroxibutirato (<50 → 650; (N) 300 μ M) después de la carga sin observarse un decremento importante -- (500 μ M) en el curso de la prueba. La depuración normal de glucosa es consistente con la integridad de la vía glucolítica. El aumento de piruvato y lactato evidencian un bloqueo en la utilización del piruvato; normalmente la concentración de éstos no aumenta cuando se da una carga de glucosa. El incremento notorio de β -hidroxibutirato indica una activación sustancial de la poza de acetil-CoA al ciclo β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA. Es posible que esta respuesta paradójica defina la importancia que la PC tiene como regulador de la distribución fraccional del acetil-CoA intracelular entre el ciclo de Krebs y el ciclo β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA.

3.4 Estudio de infusión I.V. de alanina

La infusión I.V. de alanina (1.1 mmol/kg de peso corporal) permitió estudiar la integridad de la vía gluconeogénica (Fig.12). La alanina (433.3 → 1,147.06; (N) 230-411 μ M) se elevó transitoriamente y luego disminuyó (hasta 510.46 μ M) de modo gradual durante la prueba. Se observó una pequeña respuesta hiperglicémica (4.11 → 6.34 mM). La concentración basal anormal de lactato -- (3.55 → 5.72 mM) y de piruvato (399.06 → 598.9 μ M) aumentaron en

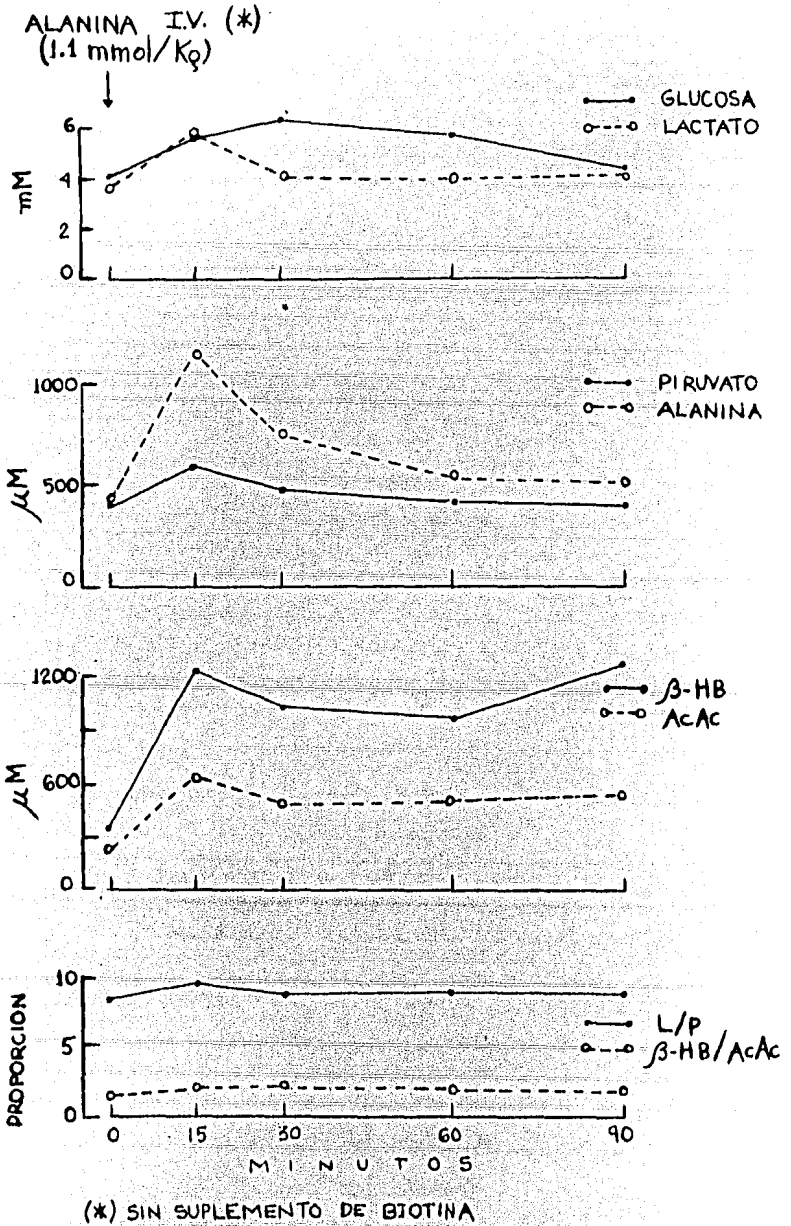


Fig. 12. Respuesta metabólica a carga I.V. de alanina después de un ayuno de 17 hrs.

forma paralela y proporcional. El β -hidroxibutirato (345.87 -- \rightarrow 1,261.58 μ M) se elevó marcadamente y permaneció alto en el -- curso de la prueba. El incremento del acetoacetato (214.86 \rightarrow 634.38 μ M; (N) $<$ 100 μ M) fue notorio. Los cocientes L/P (8.28-9.55; (N) $<$ 15) y β -HB/AcAc (1.61-2.2; (N) 2-4) se mantuvieron normales y constantes. Se observó una depuración normal de alanina, aun-- que su concentración fue persistentemente elevada sobre los lími-- tes normales. Se ha evidenciado (26, 84, 84a, 171) que solamente una pequeña fracción de la alanina exógena, administrada en la -- carga, se incorpora a la vía gluconeogénica siendo esta fracción variable interindividualmente. Se ha observado que la respuesta hiperglicémica a la infusión de alanina varía ampliamente tanto - en niños normales como en desnutridos pudiéndose observar un au-- mento en la producción de glucosa, una reducción en su utilización o bien ambos efectos (84). La variabilidad en la producción y concentración de glucosa restringen a la administración de alani-- na como una prueba útil de gluconeogénesis (84, 84a). En nues-- tro estudio, la pobre respuesta hiperglicémica y los niveles au-- mentados de lactato y piruvato son consistentes con un defecto en la vía gluconeogénica, pero no son concluyentes. La cetonemia -- persistente sugiere la activación de la vía β -hidroxi- β -metil-- glutaril-CoA (hacia síntesis de cuerpos cetónicos) resultado de - la anaplerosis deficiente por PC al no poder incorporarse suficien-- te acetil-CoA al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Los cocien-- tes normales L/P y β -HB/AcAc sugieren la ausencia de daño en la lanzadera redox entre los compartimientos citoplasmático y mitocon-- drial.

3.5 Estudio de infusión I.V. de glucosa concomitante a la administración de biotina.

Los experimentos in vivo de cargas de glucosa y de alanina se repitieron en otro periodo en que la paciente (edad de 2 años 5 meses) recibía tratamiento con dosis farmacológicas de biotina (15 mg/d). La infusión I.V. de glucosa (9.7 mmol/kg de peso corporal) se aplicó siguiendo a un ayuno de 12 horas (Fig. 13). Se observó una depuración normal de glucosa (4.36 → 24.88 mM) con un incremento notorio y luego un descenso (hasta 6.2 mM) gradual. Las concentraciones basales de lactato (1.77 → 3.8 mM), de piruvato (104.01 → 419.16 μ M) y de alanina (321.38 → 746.68 μ M) que se encontraban dentro de los límites normales se elevaron en forma marcada después de la carga, su ascenso fue gradual manteniéndose en límites altos en el curso de la prueba. Las concentraciones basales normales de β -hidroxibutirato (213.53 → 610.63 μ M) y de acetoacetato (98.22 → 315.36 μ M) aumentaron en forma moderada. Los cuerpos cetónicos (β -HB: 289.93 y AcAc: 163.72 μ M) se mantuvieron por arriba de los valores basales en el transcurso de la prueba. El cociente L/P (17.02 → 7.4) descendió y luego permaneció normal y constante. La relación β HB/AcAc (1.77-2.17) fue invariable. Los niveles basales normales de lactato, piruvato y alanina reflejan el efecto benéfico de la terapia con biotina. Sin embargo, es posible que haya ocurrido una normalización parcial del bloqueo metabólico ya que las concentraciones excesivas de lactato, piruvato y alanina siguiendo a la sobrecarga con glucosa confirman una limitación de flujo. La síntesis paradójica - aumentada de cuerpos cetónicos, cetonemia persistente, sugiere la

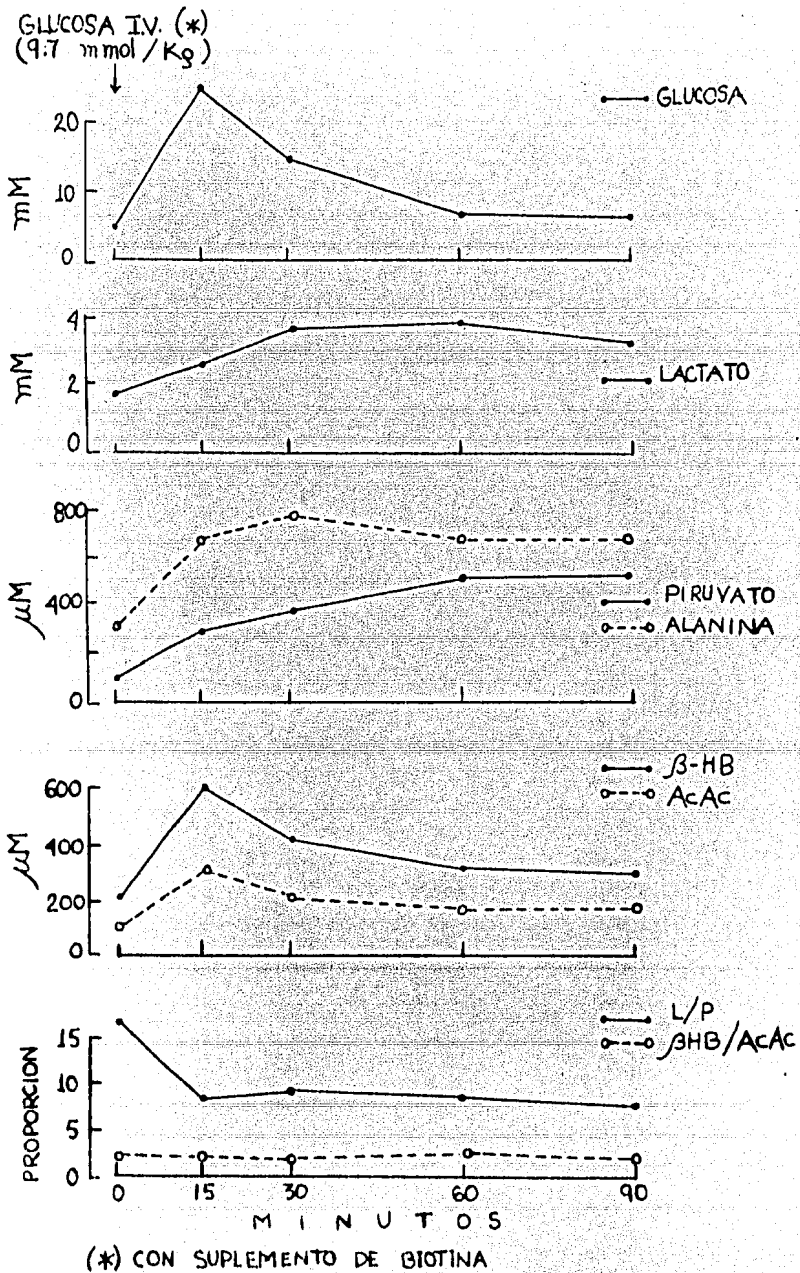


Fig. 13. Respuesta metabólica a carga I.V. de glucosa después de un ayuno de 12 hrs.

movilización sustancial de acetyl-CoA al ciclo β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA. Estos resultados reflejan la actividad deficiente de la carboxilasa de piruvato que limita la producción de oxalacetato causando un aumento de cetogénesis y daño en la operación adecuada del ciclo de Krebs. Los equilibrios $L \leftrightarrow P$ y $\beta\text{-HB} \leftrightarrow \text{AcAc}$ parecen mantenerse normalmente como lo evidencian la ausencia de cambios en los cocientes NADH/NAD citosólico y mitocondrial dados por las relaciones L/P y $\beta\text{-HB}/\text{AcAc}$, respectivamente.

3.6 Estudio de infusión I.V. de alanina concomitante a la aplicación de terapia con biotina.

La administración I.V. de alanina (1.1 mmol/Kg de peso corporal) concomitante a la aplicación de terapia con biotina (15 mg/d) siguió a un ayuno de 11 horas (Fig 14). Se produjo una depuración normal de alanina, la concentración basal de alanina (339.57 \rightarrow 746.58 μ M) ascendió notoriamente y luego se redujo (hasta 388.52 μ M) de manera gradual. El nivel basal normal de piruvato (218.42 \rightarrow 332.18 μ M) se elevó ligeramente y luego descendió (231.8 μ M) hasta cifras normales. El lactato (2.01 \rightarrow 2.8 mM) ascendió de forma mínima y se mantuvo por arriba del nivel normal. No ocurrió respuesta hiperglicémica (4.75 \rightarrow 4.83 mM). El β -hidroxibutirato (280.35 \rightarrow 697.79 μ M) experimentó un aumento notorio sin que ocurriera descenso en el curso de la prueba (512.92-680 μ M). El acetoacetato (70.08 \rightarrow 230.74 μ M) aumentó moderadamente y descendió (107.55 μ M) ligeramente por arriba de los límites normales. Los cocientes L/P (7.53-10.06) y $\beta\text{-HB}/\text{AcAc}$ (3.02-4.99) eran persistentemente normales. La ausencia de res-

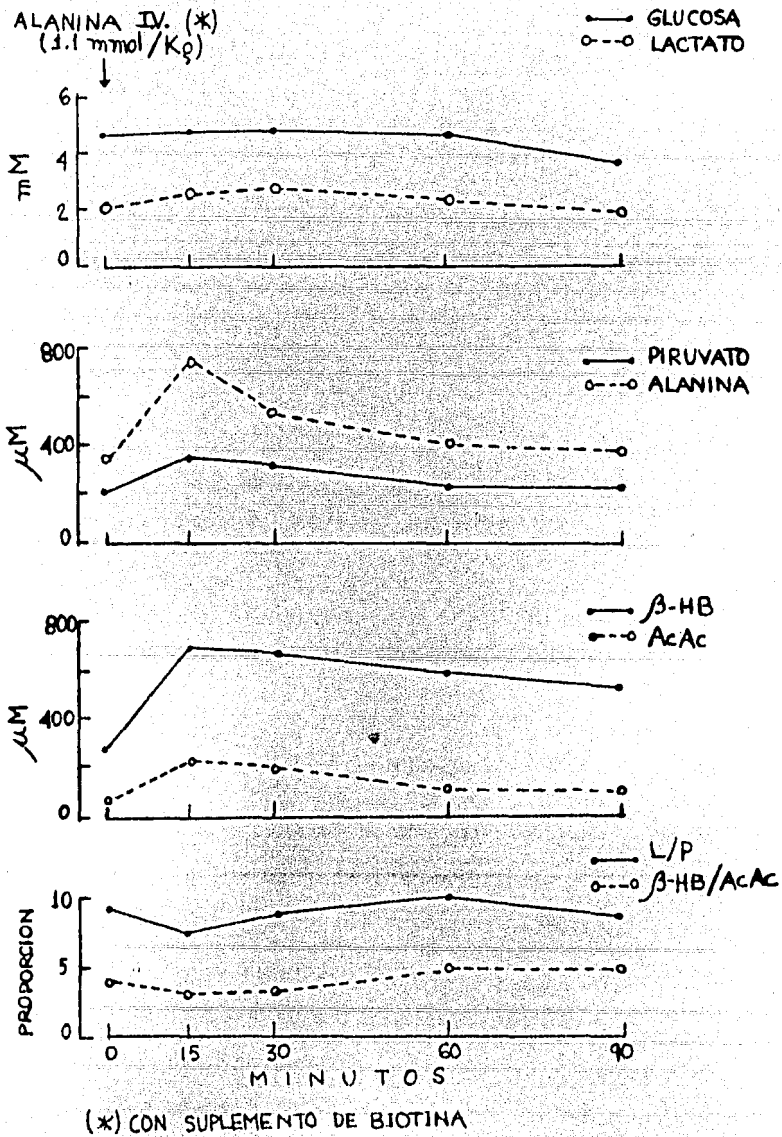


Fig. 14. Respuesta metabólica a carga I.V. de alanina después de un ayuno de 11 hrs.

puesta hiperglicémica parece paradójica con respecto a la que se observó en la prueba de alanina no suplementada con biotina. Es posible que en estos resultados influya el hecho de que la niña se expuso a un ayuno menor (de 11 horas) que cuando no se dió biotina (ayuno de 17 horas) ya que se ha documentado que en SML el ayuno prolongado (24 horas) parece aminorar el bloqueo metabólico. Los valores basales normales de alanina, piruvato y lactato son consistentes con la corrección de las anomalías metabólicas provocada por la administración de biotina. La ligera elevación de lactato y piruvato después de la carga aluden a una pequeña activación de la vía bloqueada, posiblemente como resultado de la terapia con biotina. Sin embargo, la hipercetonemia moderada persistente confirma la posible saturación de esta vía (PC) al aumentar el flujo de sustratos. Los cocientes L/P y β -HB/AcAc reflejan un estado oxidorreductor normal.

3.7 Respuesta bioquímica a ayuno de 24 horas.

Para evaluar aspectos de la importancia crucial del piruvato en el metabolismo intermediario, se estudió la respuesta bioquímica de la paciente (edad 2 años 5 meses) expuesta a un ayuno de 24 horas (Fig. 15). Se intentó evidenciar la respuesta hipoglicémica severa que se asocia con un bloqueo en la vía gluconeogénica. En contradicción con lo esperado, la paciente permaneció normoglicémica (glucosa: 3.96-5.0 mM) durante todo el ayuno. Las concentraciones de lactato (4.05 \rightarrow 1.85 mM), piruvato (358.9 \rightarrow 171.61 μ M) y alanina (948.11 \rightarrow 355.56 μ M) descendieron en forma significativa a límites normales (lactato y alanina) o ligeramen-

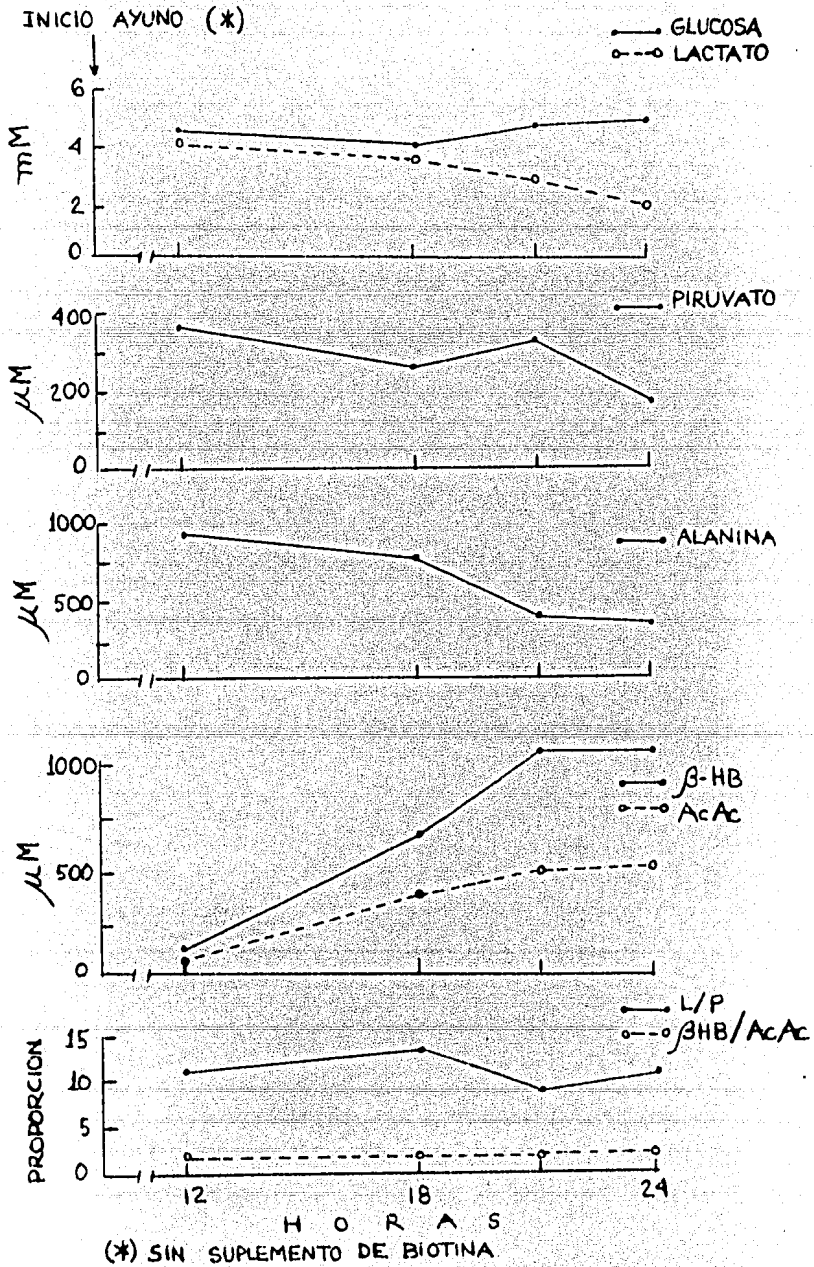


Fig. 15. Respuesta metabólica a ayuno de 24 hrs.

te por arriba de la concentración normal (ej. piruvato). El β -hidroxibutirato ($143.2 \rightarrow 1,084.19 \mu\text{M}$) y el acetoacetato ($81.86 \rightarrow 537.70 \mu\text{M}$) se elevaron notoriamente y en forma paralela y proporcional. Los cocientes L/P (9.37-13.54) y β -HB/AcAc (1.75-2.12) se mantuvieron casi invariables. La ausencia de una respuesta hipoglicémica al ayuno y el decremento sustancial de lactato, piruvato y alanina a valores casi normales reflejan una notoria actividad residual de la carboxilasa del piruvato que permite un flujo gluconeogénico importante del piruvato. La hipercetonemia constante evidenció una β -oxidación acelerada de ácidos grasos la cual incrementó la poza intracelular de acetyl-CoA, modulador alostérico de la PC, induciendo de esta forma un aumento en la actividad de la enzima mutante y superando así el bloqueo metabólico. Es posible que la acumulación del acetyl-CoA se vea favorecida -- por el hecho de que el flujo de acetyl-CoA al ciclo de Krebs está limitado como resultado de la anaplerosis severamente deprimida y provocada por la actividad deficiente de la PC. Los cocientes -- normales y constantes L/P y β -HB/AcAc sugieren que no hay daño en la lanzadera redox entre los compartimientos citoplasmático y mitocondrial.

3.8 Estudios experimentales de cetosis (prescripción de dietas cetónicas)

Para establecer si el ayuno de 24 horas o bien la cetosis inducida por el ayuno eran los responsables de la normalización metabólica fundamentalmente en los niveles sanguíneos de lactato piruvato y alanina que se observó en la paciente, ella fue some-

tida a varios estudios experimentales de cetosis prescribiéndole dietas cetónicas. A la edad de 1 año 9 meses fue expuesta (por un periodo de 13 semanas) a una dieta grasa rica en triglicéridos de cadena media y con baja proporción de carbohidratos para causar en ella cetonemia (cuerpos cetónicos sanguíneos: 1.5-2.0 mM) y cetonuria, pero sin provocar hipoglicemia o acidosis metabólica. Los triglicéridos de cadena media ingresan sin limitación a la mitocondria donde son oxidados; en contraste, los ácidos grasos de cadenas largas requieren enlazarse a carnitina siendo sólo de esta forma libremente permeables por lo que su oxidación depende de su transporte a la mitocondria. A los 3 años 5 meses, la terapia cetónica fue administrada (por un periodo de 5 semanas) estando la paciente hospitalizada. En ambas dietas experimentales la fórmula cetogénica proveía 1.200 Kcal/d --(grasas)65% : (Carbohidratos)20% : (Proteínas)15%-- y se aplicaron concomitantes con terapia de anticonvulsivante. En el ayuno, la glucosa resultó normal (4.71-5.0 mM); el lactato (3.1-3.6 mM) y el piruvato (231.8-305.4 μ M) permanecieron arriba de los límites normales. La concentración de alanina (388.52-500.45 μ M) era moderadamente elevada. El β -hidroxibutirato (115.12 \rightarrow 297.02 μ M) y el acetoacetato -- (49.11 \rightarrow 117.84 μ M) se incrementaron en forma moderada. La normoglicemia sugiere una actividad residual importante de la PC como soporte gluconeogénico. Sin embargo, el aumento moderado de la pzoa de acetyl-CoA, medido por la cetonemia observada, restableció parcialmente la actividad de la PC mutante ya que no ocurrió un descenso crítico de lactato, piruvato y alanina. Es probable que la normoglicemia refleje la accesibilidad relativa de precur-

sores alternos (aspartato, glutamato y glutamina) para la síntesis de oxalacetato. Durante la aplicación de la dieta cetonémica se observó normoglicemia (glucosa: 4.3-6.4 mM). Los niveles sanguíneos de lactato (3.6 — 2.34 mM), piruvato (305.4 → 164.9 μ M) y alanina (500.45 → 209.45 μ M) experimentaron una reducción significativa sin alcanzar los límites normales (ej. piruvato y lactato). El β -hidroxibutirato se elevó sustancialmente (297.02 → 1,145.34 μ M) y el acetoacetato (117.1 → 287.16 μ M) en menor nivel. Los cocientes L/P y β -HB/ACAc (11.8-14.1 y 2.54-4.0, respectivamente) fueron casi invariables. No se registró acidosis bioquímica ni clínica y ocurrió un control adecuado de las crisis convulsivas durante el ayuno y en la aplicación de la dieta. La terapia cetonémica indujo una normalización bioquímica importante al reducir notoriamente los niveles de lactato, piruvato y alanina. Estos hallazgos reflejan la activación de la PC resultante de la poza incrementada de acetyl-CoA, medida por la cetonemia persistente.

En otro periodo (edad de 3 años 10 meses) la fórmula cetogénica prescrita (aplicada por 7 semanas) fue suplementada con -- aceite de coco en lugar de emplear triglicéridos de cadena media. La paciente experimentó cuadro cetósico después de un ayuno de 69 horas. En esta ocasión se administraron gradualmente, incrementando el aporte de grasas y reduciendo el suministro calórico por carbohidratos, tres fórmulas cetogénicas: a) Dieta I con 1.200 Kcal/d --(Grasas)65% : (Carbohidratos)20% : Proteínas)15%--; b) Dieta II con 1,200 Kcal/d --(Grasas)70% : (Carbohidratos)18% :

(Proteínas)12%--; y c) Dieta III con 1,300 Kcal/d --(Grasas)80% : (Carbohidratos)15% : (Proteínas)10%-- (Figuras 16, 17). Este estudio de cetosis se dividió en dos fases: 1) en la primera etapa se aplicó la dieta simultáneamente con terapia de anticonvulsivante (carbamazepina, 30 mg/kg/d); y 2) en la segunda fase la dosis de anticonvulsivante se redujo de manera gradual hasta suprimirla por completo, para determinar si las crisis convulsivas eran controladas únicamente por la dieta o bien si en su control se asocian los efectos de la dieta misma y del anticonvulsivante. La valoración del comportamiento bioquímico de la niña durante el ayuno y en el curso de la terapia cetonémica se hizo en muestras de plasma (Figuras 16, 17). En el ayuno ocurrió normoglicemia -- (1.8-3.33; (N)3.89-5.55 mM). Los niveles de lactato (2.5→0.85; (N) 0.55-2.2 mM), piruvato (190.2→75.5; (N)54-244 μ M) y alanina (366.14→153.02; (N) 140-300 μ M) descendieron a límites normales. El β -hidroxibutirato (235.72→1,250.21; (N)50-600 μ M) y el acetoacetato (41.31→235.68; (N) <100 μ M) se elevaron en forma importante. Los cocientes L/P (13.14-11.26; (N)8-20) y β -HB/AcAc (5.7-5.31; (N)2-4) casi no cambiaron encontrándose en límites normales. El mantenimiento de la glicemia normal y la mejoría bioquímica -reducción de lactato, piruvato y alanina hasta límites normales- inducidos por el ayuno evidenciaron una actividad gluconeogénica restablecida. Esta fue estimulada posiblemente -- por la poza intracelular incrementada de acetil-CoA resultante de la movilización acelerada de grasas, medida por la cetonemia sustancial y constante. Las respuestas metabólicas a la terapia cetonémica resultaron en normoglicemia (glucosa: 3.6-7.8 mM), el --

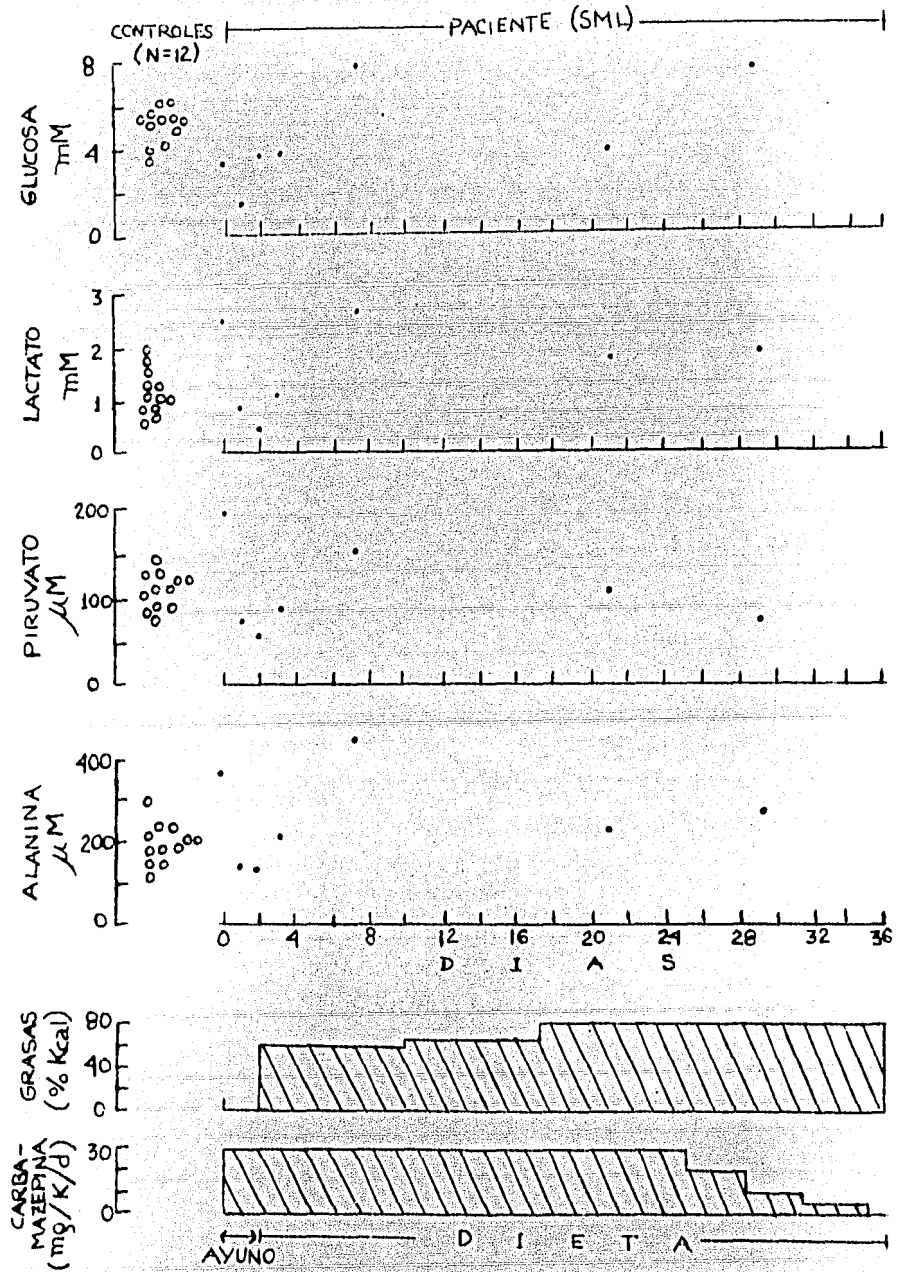


Fig. 16. Respuesta metabólica a la administración gradual de la -
 terapia cetogénica prescrita, iniciada después de un -
 ayuno de 69 hrs.

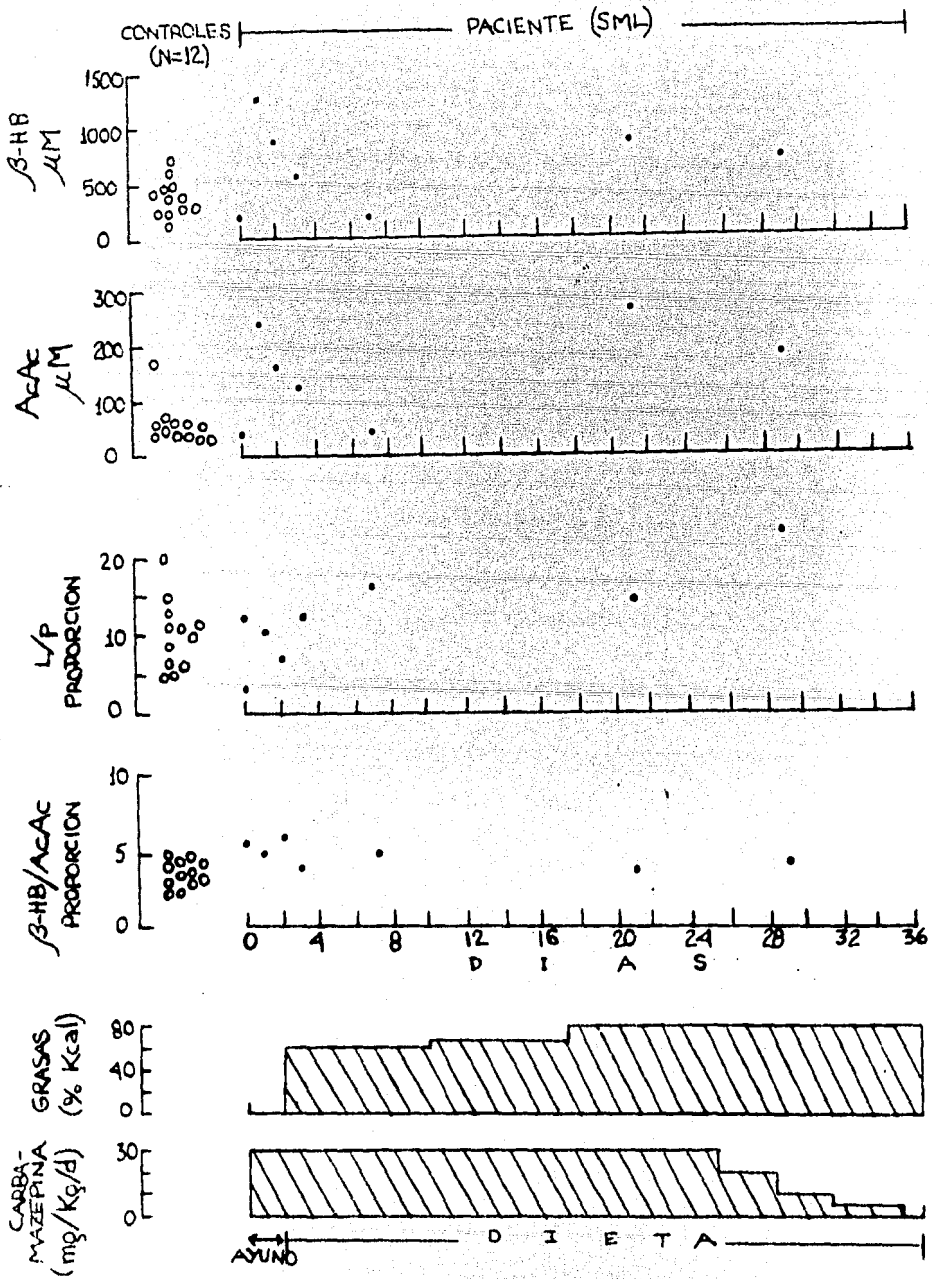


Fig. 17. Respuesta metabólica a la administración gradual de la -- terapia cetogénica prescrita e iniciada después de un -- ayuno de 69 hrs.

lactato (0.5-2.65 mM) y el piruvato (63.29-155 μ M) permanecieron en límites normales. La alanina (209.45-432.43 μ M) varió hasta un nivel ligeramente superior al normal. Las concentraciones de β -hidroxibutirato (250.03 \rightarrow 950.13 μ M) y acetoacetato (49.1 \rightarrow 258.94 μ M) se elevaron en forma notoria. Los cocientes L/P (7.9-23.3) y β -HB/AcAc (5.63-5.9) se mantuvieron en límites normales. La niña no experimentó cuadro cetoacidótico severo y observó un control satisfactorio de crisis convulsivas durante el ayuno y en el curso de la terapia aún cuando se suprimió la carbamazepina. Desde el punto de vista bioquímico se ha sugerido que una dieta rica en grasas puede tener un valor terapéutico en la disminución de las anormalidades metabólicas y clínicas en pacientes con oxidación deficiente del piruvato (18, 19, 30, 37, 43). La fórmula cetónica provista por ácidos grasos -donde más del 45% de las calorías totales son administradas por triglicéridos de cadena media-o por cuerpos cetónicos aporta precursores metabólicos alternos para la síntesis intracelular de acetyl-CoA disminuyendo teóricamente las demandas metabólicas de la vía defectiva. La dieta elevada en grasas cambia el potencial oxidorreductor intramitocondrial a un estado más reducido produciendo una inhibición de la actividad del complejo PDHC y una activación sustancial de la carboxilasa del piruvato, PC, al aumentar la poza intracelular de acetyl-CoA (30, 43, 68, 139, 188, 215). El acetyl-CoA es el efector positivo crítico de la PC (24, 158, 218, 236).

En los tres estudios de cetosis la acumulación del acetyl-CoA se midió indirectamente cuantificando los cuerpos cetónicos -

(β -hidroxibutirato y acetoacetato) en sangre o plasma y observándose una cetonuria constante. La medición posterior de la PC en linfocitos de sangre periférica de la niña mostró que la actividad de la enzima se normalizó (Velázquez, A. y cols. Trabajo sometido a Publicación). Tanto el ayuno prolongado (> 48 horas) como la dieta cetogénica expanden la poza de acetyl-CoA que reactiva a la PC. Esto se debe no sólo a la bien establecida dependencia alostérica de la PC por el acetyl-CoA sino especialmente al aumento en la biotinización de la apocarboxilasa en la cual el acetyl-CoA desempeñaría también un papel importante. Se ha demostrado en Bacillus thermophilus (29, 222) que el acetyl-CoA confiere un cambio conformacional a la apocarboxilasa pirúvica facilitando la unión de biotina a la apoenzima, esto debe de activar a la holocarboxilasa pirúvica de tal manera que es posible que a través de uno o ambos mecanismos se haya incrementado sustancialmente la actividad de la PC mutante lo cual condujo a la normalización de los niveles de piruvato y de lactato.

Tanto la cetosis inducida por la fórmula calórica en triglicéridos de cadena media como la generada por la fórmula suplementada con aceite de coco, ejercieron un efecto metabólico benéfico observándose una reducción importante de lactato, piruvato y alanina así como un incremento en el flujo gluconeogénico medido por la normoglicemia persistente y por la reactivación de la PC mutante en linfocitos de sangre periférica de la niña (Velázquez A. y Cols. Trabajo sometido a publicación). La reducción de las anomalías clínicas se evidenció por la ausencia de acido-

sis láctica-pirúvica y por un control satisfactorio de las crisis convulsivas. La niña no experimentó convulsiones aún cuando se suspendió la carbamazepina.

VII. CONCLUSIONES

Cada una de las técnicas microfluorométricas enzimáticas - montadas para la medición de los metabolitos estudiados -glucosa, piruvato, lactato, alanina, β -hidroxibutirato, acetoacetato, citrato, α -cetoglutarato, glutamato, glutamina y aspartato- fueron estandarizadas en forma óptima evaluando satisfactoriamente los - parámetros de exactitud, precisión, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad del ensayo enzimático respectivo.

Los sistemas enzimáticos utilizados se acoplan a la oxidoreducción de los nucleótidos de piridina (NADH , NADPH , NAD^+ , NADP^+) proceden como reacciones bioquímicas estequiométricas. La cantidad de nucleótido oxidado o reducido, medida por el decremento o incremento en la fluorescencia nativa respectivamente, resultó directamente proporcional a la cantidad de sustrato (metabolito) -- oxidado o reducido selectiva y específicamente en el sistema de reacción. La linealidad de las curvas estandar trazadas permitió leer con elevada confiabilidad las muestras biológicas, sangre o plasma, procesadas como extractos neutros. La recuperación cuantitativa de cada sustrato particular aún en presencia de varios - sustratos interferentes en el sistema de ensayo permitió el monitoreo de estas técnicas sin recurrir a procedimientos previos de purificación de las muestras biológicas. La especificidad inherente de las reacciones enzimáticas ensayadas inhibe cualquier -- reacción interferente.

Por ser técnicas de elevada sensibilidad constituyen un método valioso para el análisis cuantitativo de metabolitos presen-

tes en concentración normal o en niveles patológicos. En una amplitud considerable de concentración del metabolito particular, se obtuvo una precisión, exactitud y reproducibilidad adecuadas en cada ensayo. Las técnicas fluorométricas estandar desarrolladas constituyen un método simple y rápido para valorar micromuestras biológicas en un volumen normal del sistema de ensayo y empleando reactivos diluidos. Es posible valorar varias muestras al mismo tiempo, aún por duplicado, obteniendo precisión, exactitud y reproducibilidad adecuadas.

Empleando esta metodología se obtuvo el perfil de valores bioquímico-clínicos de metabolitos en individuos mexicanos. Por vez primera se delineó el perfil metabólico basal normal en niños cuyas edades fluctuaban entre un mes y hasta catorce años; lo mismo se hizo con una población adulta cuyas edades fluctuaban entre 19 y 45 años, ambas poblaciones eran metabólicamente sanas. El estandar de valores normales obtenido para la población mexicana servirá para estudiar las desviaciones patológicas en pacientes con errores innatos del metabolismo, así como para el descubrimiento de algunos de ellos. El esquema de valores bioquímico-clínicos se estableció midiendo los metabolitos clave de las vías glucolítica y gluconeogénica (glucosa, piruvato y lactato); los aminoácidos gluconeogénicos primarios (alanina y glutamina); los metabolitos intermedios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (α -ceto glutarato y citrato); aminoácidos precursores anapleróticos de este ciclo (glutamato, glutamina y aspartato) y los cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato y acetoacetato).

La aplicación del esquema metabólico basal normal se utilizará para cuantificar metabolitos intermediarios deficientes o en concentraciones excesivas y nos permitirá aclarar el sitio exacto de la lesión metabólica en los errores innatos del metabolismo -- así como especular acerca de posibles estrategias terapéuticas. Estos enfoques fueron utilizados en el caso clínico estudiado en esta tesis. Se integró el fenotipo clínico y bioquímico de la paciente, con deterioro neurológico severo y acidosis láctico-pirúvica persistente, evidenciándose el sitio del bloqueo metabólico responsable de la hiperalaninemia, hiperpiruvicemia e hiperlactatemia. Estudios previos establecieron que la paciente presentaba deficiencia múltiple de carboxilasas --propionil CoA, β -metilcrotonil CoA y piruvato carboxilasa--, enzimas que requieren de biotina como cofactor (González Noriega, A.; Ortiz, R. y Velázquez A; manuscrito en preparación).

La deficiencia de piruvato carboxilasa fue sugerida por -- los estudios funcionales llevados a cabo en ella, específicamente la elevación de β -hidroxibutirato en respuesta a la carga de glucosa y de alanina; la baja respuesta glicémica a la administración de alanina; y la reducción de los niveles de piruvato en sangre -- después de aplicar megadosis de biotina.

El incremento notorio de β -hidroxibutirato, paradójicamente se esperaría una reducción progresiva de éste en la sangre después de la carga de glucosa, indica una activación importante de la poza de acetil CoA al ciclo β -hidroxi, β -metilglutaril-CoA -

(hacia síntesis de cuerpos cetónicos). Esta respuesta sugiere posiblemente la importancia que la piruvato carboxilasa tiene como modulador de la distribución fraccional del acetyl CoA intracelular entre el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (esta función -- anaplerótica está deprimida) y el ciclo β -hidroxi, β -metilglutaril-CoA y la vía lipogénica.

Los resultados a la carga oral de alanina son consistentes con la deficiencia de piruvato carboxilasa, pero no concluyentes ya que hay individuos normales en los que la glucosa en sangre -- puede no aumentar después de la carga de alanina. Se presume que ésto se debe al efecto insulínogénico de la alanina y a la estimulación subsecuente para utilizar la glucosa (4, 69, 84, 84a). Los efectos variables sobre producción y concentración de glucosa después de la carga indican que esta prueba puede no ser útil para valorar defectos en la gluconeogénesis.

La terapia con biotina casi normalizó los niveles de piruvato y lactato en sangre. Sin embargo, en las pruebas de sobrecarga de glucosa o alanina aplicadas en forma simultánea con biotina ocurrió una limitación del flujo de estos metabolitos no superando el bloqueo gluconeogénico. Es posible que la terapia con biotina estimule la actividad de la piruvato carboxilasa residual estableciendo un flujo suficiente de glucosa y alanina en las concentraciones fisiológicas de la paciente.

En respuesta al ayuno de 24 horas la paciente observó nor-

moglicemia y niveles normales de lactato, piruvato y alanina. Es-
 tos resultados corroboran una actividad gluconeogénica sustancial
 desde piruvato que posiblemente sea estimulada por el bloqueo del
 flujo de acetil CoA al ciclo de los ácidos tricarbóxicos o por
 la anaplerosis deficiente. La hipercetonemia evidenció una movi-
 lización importante de grasas. Es posible que los cuerpos cetóni-
 cos cubran los requerimientos energéticos cerebrales al saturarse
 la utilización de éstos por otros tejidos. El incremento de la -
 poza de acetil-CoA intracelular (modulador alostérico de la piru-
 vato carboxilasa) la cual deriva de la β -oxidación acelerada de
 los ácidos grasos aumenta la actividad de la piruvato carboxilasa
 y por ende, la función gluconeogénica.

La regulación de las dietas cetogénicas --suplementadas
 con triglicéridos de cadena media o bien con aceite de coco-- y
 la cetonemia inducida por éstas, ejercieron un efecto metabólico
 favorable y de valor terapéutico anticonvulsivante. Es claro que
 el cerebro utiliza efectivamente los cuerpos cetónicos cuando su
 concentración en sangre se eleva a 1-2 mM (42, 154). La oxidación
 de los cuerpos cetónicos en el cerebro provee una fuente alterna-
 tiva de acetil-CoA a la vía obligatoria de oxidación de piruvato
 en la célula nerviosa. La acumulación excesiva de acetil-CoA - -
 reactiva a la piruvato carboxilasa mutante. Esta soportará una -
 actividad gluconeogénica sustancial a partir del piruvato y de --
 otros precursores alternos (glutamina, glutamato y aspartato).
 Es posible que ocurra una mínima restauración del metabolismo - -
 energético cerebral como consecuencia del aumento del flujo de me

tabolitos a través del ciclo de Krebs al restablecerse parcialmente la actividad anaplerótica de la piruvato carboxilasa. Se esperaría un incremento en la síntesis de los aminoácidos neurotransmisores como son glutamato y aspartato y de γ -aminobutirato (GABA). El esqueleto carbonado de éstos deriva de metabolitos intermedios del ciclo.

A pesar de la dificultad en la actividad del ciclo de Krebs, debe generarse suficiente ATP que cubra los requerimientos celulares. Es posible que el daño neurológico que exhibe la paciente se deba a una deprivación importante del metabolismo energético cerebral. Varios autores han sugerido que la administración de dietas terapéuticas apropiadas y suplementadas con aspartato y/o glutamina puedan aumentar el flujo de metabolitos a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos por vías alternas a la piruvato carboxilasa. Las bases de la terapia glutamato/aspartato fueron dadas por De Vivo et al. (37) quienes demostraron un decremento en los intermediarios del ciclo principalmente citrato, α -cetoglutarato y malato en una paciente con defecto en la piruvato carboxilasa.

En virtud de la reactivación de la piruvato carboxilasa con megadosis de biotina (efecto observado también en fibroblastos en cultivo derivados de la paciente) se estableció que esta alteración metabólica constituye una dependencia vitamínica hereditaria. En estas alteraciones, la administración de dosis farmacológicas del cofactor apropiado aumenta la actividad catalítica de la enzima mutante y de esta forma, supera el bloqueo metabólico.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

1. Alberti, K.G.M.M., Johnston, D.G., Burrin, J., Blesa-Malpica, G., McCulloch, A., Nosadini, R. and Walker. Ketogenesis: Regulatory factors in vivo. *Biochem. Soc. Trans.* 9:8-9 (1981).
2. Aragon and Lowenstein, J.M. The Purine-Nucleotide Cycle. *J. Biochem.* 110:371-77 (1980).
3. Askanazi, J., Carpentier, Y.A., Michelsen, C.B., Elwyn, D.H., Furst, P., Kantrowitz, L.R., Gump, F.E. and Kinney, J.M. Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. *Ann. Surg.* 192: 78-85 (1980).
4. Atkin, B.M., Buist, N.R.M., Utter, M.F., Leiter, A.B. and Banker, B.Q. Pyruvate carboxylase deficiency and lactic acidosis in a retarded child without Leigh's disease. *Pediatr. Res.* 13: 109-116 (1979).
5. Atkin, B.M., Utter, M.F. and Weinberg M.B. Pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in leukocytes and fibroblasts from a patient with pyruvate carboxylase deficiency. *Pediatr. Res.* 13:38-43 (1979).
6. Bartlett, K. and Gompertz, D. Biotin activation of carboxylase activity in cultured fibroblasts from a child with a combined carboxylase defect. *Clin. Chim. Acta*: 84:399-401 (1978).
7. Bartlett, K., N.G. H., Dale, G., Green, A. and Leonard, J.V. Studies on cultured fibroblasts from patients with defects of biotin-dependent carboxylation. *J. Inher. Metab. Dis.* 4:183-189 (1981).

8. Bartlett, K., Helen, N.G., Leonard, J.V. A combined - defect of three mitochondrial carboxylases presenting as biotin-responsive, 3-methylcrotonyl glycinuria and 3-hydroxyisovaleric aciduria. *Clin. Chim. Acta* 100: 183-186 (1980).
9. Bates, E. and Saggerson, E.D. *Biochem. J.* 182:757-762 (1979).
10. Bates, E.J., Topping, D.L., Sooranna, S.R., Saggerson, D. and Mayes, P. *FEBS Letts.* 84:225-228 (1977).
- 10a. Bearn, A. G. Errores innatos del metabolismo y enfermedades moleculares. En Cecil-Loeb, McDermott, B. y McDermott, W. *Tratado de Medicina Interna*. Editorial Interamericana. 1978.
11. Beisel, W.R. Metabolic effects of infection. *Progress in food and nutrition science.* 8:43-75 (1984).
12. Beisel, W.R., Sawyer, W.D., Ryll, E.D. and Crozier, D. Metabolic effects of intracellular infections in man. *Ann. Internal. Med.* 17:744-779 (1967).
13. Beisel, W.R. and Wannemacher, R.W. Gluconeogenesis and ureagenesis and ketogenesis during sepsis. *J. Parent. Enteral. Nutr.* 4:277-285 (1980).
14. Bergmeyer, H.U. and Gawehn, K. (eds.). *Principles of enzymatic analysis*. Verlag Chemie Weinheim. New York (1978).

- basis of inherited disease. McGraw-Hill, New York -
So. ed. (1983).
20. Bournieres, P.F., Ferré, P., Chaussain, J.L. and Job, J. C. Glucose metabolism in hyperinsulinemic infants: the effects of fasting and sodium DL- β -hydroxybutyrate on glucose production and utilization rates. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57:1054-1060.
 21. Boulter, P.R., Hoffman, R.S. and Arky, R.A. Patterns of sodium excretion in starvation. *Metabolism* 22:675 - (1973).
 22. Bauer, J.D., Toro, G. and Ackermann, P.G. (eds.). *Bray's clinical laboratory methods*. The C.V. Mosby Company, St. Louis M.O. 6o. ed. (1962).
 23. Brown, P.M., Gundoggu, S., Wilson, N. and Sönksen, P.H. Gluconeogenesis and its regulation: regulation of glucose production in vivo. *Biochem. Soc. Trans.* 6: 1134-1138 (1978).
 24. Brunette, M.G., Delvin, E., Hazel, B. and Scriver, C.R. Thiamine-responsive acidosis in a patient with deficient low-Km pyruvate carboxylase activity in liver. *Pediatrics* 50:702-711 (1972).
 25. Buist, N.R.M. Is pyruvate carboxylase involved in the renal tubular reabsorption of bicarbonate? *J. Inher. Metab. Dis.* 3:113-116 (1980).
 26. Cahill, G.F. Starvation in man. *N. Engl. J. Med.* - 282: 668-675 (1970).

15. Bergmeyer, H.U. (ed). Methods of enzymatic analysis. Academic Press Inc. New York (1974).
- 15a. Bergmeyer, H.U. Terminology, importance and limits of enzymatic analysis. In Bergmeyer, H.U. and Gawehn, K. (eds.). Principles of enzymatic analysis. Verlag - Chemie. Weinheim. New York, 1978.
- 15b. Bergmeyer, H.U. Determination of substance concentration of metabolites (End-Point Methods). In Bergmeyer, H.U. and Gawehn, K. (eds.). Principles of enzymatic - analysis. Verlag Chemie. Weinheim. New York, 1978.
- 15c. Bergmeyer, H.U. Reagents for enzymatic analysis. In Bergmeyer, H.U. and Gawehn, K. (eds.). Principles of - enzymatic analysis. Verlag Chemie. Weinheim. New York, 1978.
16. Blass, J.P. Disorders of pyruvate metabolism. Neurology. 29:280-286 (1979).
17. Blass, J.P., Kark, R.A.P. and Engel, W.K. Clinical studies of a patient with pyruvate decarboxylase deficiency. Arch. Neurol. 25:449 (1971).
18. Blass, J.P. Pyruvate deshydrogenase deficiencies. In Burman, D., Holton, J.B. and Pennock, C.A. (eds.). Inherited disorders of carbohydrate metabolism. MTP, Lancaster (1980).
19. Blass, J.P. Inborn errors of pyruvate metabolism. In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (eds.). The metabolic

27. Cahill, G.F., Herrera, M.G., Morgan, A.P., Soeldner, J.S., Steinke, J., Leyvy, P.L., Reichard, G.A. and Kipnis, D.M. - Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J. Clin. Invest.* 45:1751-1769 (1966).
28. Cahill, G.F., Owen, O.E. and Morgan, A.P. The consumption of fuels during prolonged starvation. *Adv. Enzyme. Regul.* 6:143-150 (1968).
29. Cazzulo, J.J., Sundaram, T.K. and Kornberg, H.L. Regulation of pyruvate carboxylase formation from the apoenzyme and biotin in a thermophilic bacillus. *Nature.* 223:1137-1138 (1969).
30. Cederbaum, S.D., Blass, J.P., Minkoff, N., Brown, W.J. Sensitivity to carbohydrate in a patient with familial intermittent lactic acidosis and pyruvate dehydrogenase deficiency. *Pediat. Res.* 10:713-720 (1976).
31. Clowes, G.H.A., Randall, H.T. and Cha, C.J. Amino acid and energy metabolism in septic and traumatized patients. *J. Parent. Enteral. Nut.* 4:195-205 (1980).
32. Curnow, R.T., Rayfield, E.J. George, D.T., Zenser, T.V. and DeRubrtis, F.R. Altered hepatic glycogen metabolism and glucoregulatory hormones during sepsis. *Am J. Physiol.* 230:1296-1301 (1976).
33. Cahill, G.F. and Auri, J.J. Amino acid cycles in man - *Curr. Top. Cell. Regul.* 18 :389 (1984).
34. Davis, E.J., Spydevold, Ø. and Bremer, J. Pyruvate carboxylase and propionyl-CoA carboxylase as anaplerotic enzymes in skeletal muscle mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 110:255-262 (1980).

35. Delvin, E., Scriver, C.R. and Neel, J.L. Pyruvate carboxylase in human liver. Apparent loss of a component of catalytic activity in a form of lactic acidosis with hypoglycemia. *Biochem. Med.* 10:97-106 (1974).
36. Denton, R.M. and Halestrap, A.P. Pathways and regulation of pyruvate metabolism. In Burman, D., Holton, J. B. and Pennock, C.A. (eds.). *Inherited disorders of carbohydrate metabolism*. MTP, Lancaster (1980).
37. DeVivo, D.C., Haymond, M.W., Leckie, M.P., Bussman, Y.L., McDougal, D.B. and Pagliara, A.S. The clinical and biochemical implications of pyruvate carboxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45:1281-1296 (1977).
38. Donnell, G.N., Lieberman, E., Shaw, K.N.F. and Kock, R. Hypoglycemia in maple syrup urine disease. *Amer. J. Dis. Child.* 113:60 (1967).
39. Drewes, P.A. Carbohydrate derivatives and metabolites. In Henry, R.J., Cannon, D.C. and Winkelman, J.W. (eds.). *Clinical Chemistry principles and technics*. Bio-Science Laboratories 2o. ed. (1974).
40. Elphick, M.C. and Wilkinson, A.W. The effects of starvation and surgical injury on the plasma levels of glucose, free fatty acids and neutral lipids in newborn babies suffering from various congenital anomalies. *Pediatr. Res.* 15:313-318 (1981).
41. Evered, D.F. Advances in amino acid metabolism in mammals. *Biochem Soc. Trans.* 9:159-169 (1981).
42. Exton, J.H. Progress in endocrinology and metabolism, gluconeogenesis. *Metabolism* 21:945-989 (1972).

43. Falk, R.E., Cederbaum, S.D., Blass, J.P., Gary, E., Kark, R.A., Pieter, M.D. and Carrel, R.E. Ketonic diet in the management of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Pediatrics* 58:713-721 (1976).
44. Felig, P. Amino acid metabolism in man. *Annu. Rev. Biochem.* 44:933-955 (1975).
- 44a. Felig, P. The glucose-alanine cycle. *Metabolism* 22:179-207 (1973).
- 44b. Felig, P., Kim, Y.J., Lynch, V., Hendler, R. *J. Clin. Invest.* 51:1195-1202 (1972).
45. Felig, P., Owen, W.E., Wahren, J. and Cahill, G.F. Amino acid metabolism during prolonged starvation. *J. Clin. Invest.* 48:584-594 (1969).
46. Felig, P., Marliss, E., Pozefsky, T. and Cahill, G.F. Amino acid metabolism in the regulation of gluconeogenesis in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 23:986-992 (1970).
47. Felig, P., Pozefsky, T., Marliss, E. and Cahill, G.F. Alanine: key role in gluconeogenesis. *Science* 167:1003-1004 (1970).
48. Fery, F. and Balasse, E.O. The alanine-ketone body cycle hypothesis. *Metabolism* 31:1179 (1982).
49. Ferré, P., Pégorier, J.P., Williamson, D.H. and Girard, J. Interactions in vivo between oxidation of non-esterified fatty acids and gluconeogenesis in the newborn rat. *Biochem. J.* 182:593-598 (1979).

50. Forissier, M. and Baverel, G. The conversion of alanine into glutamine in guinea-pig renal cortex. *Biochem. J.* 200:27-33 (1981).
51. Foster, D.W. Diabetes mellitus. In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (eds.). *The metabolic basis of inherited disease.* McGraw-Hill, New York So. ed. (1983).
52. Garber, A.J., Karl, I.E. and Kipnis, D.M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. II The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis. *J. Biol. Chem.* 251:836-843 - - (1976).
53. Garber, A.J., Karl, I.E. and Kipnis, D.M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. IV β -adrenergic inhibition of amino acid release. *J. Biol. Chem.* 251:851-857 (1976).
54. Garber, A.J., Menzel, P.H., Boden, G. and Owen, O.E. Hepatic ketogenesis and gluconeogenesis in humans. *J. Clin. Invest.* 54:981-989 (1974).
55. Garland, P.B., Randle, P.J. and Newsholme, E.A. Citrate as an intermediary on the inhibition of phosphofructose kinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone - bodies, pyruvate, diabetes and starvation. *Nature.* - 200:169 (1963).
56. Gentz, J., Persson, B. and Zetterström, R. On the diagnosis of symptomatic neonatal hypoglycemia. *Acta Paediat. Scand.* 58:449 (1969).

57. Genuth, S.M. and Castro, J. Effect of oral alanine on blood β -hydroxybutyrate and plasma glucose, insulin, free fatty acids, and growth hormone in normal and diabetic subjects. *Metab. Clin. Exp.* 23:375-386 (1974).
58. Girard, J.R., Ferré, P., Manoubi, L. and Pégorier, J.P. Ketone-body metabolism during the neonatal period. *Biochem. Soc. Trans.* 9:344-345 (1981).
59. Gompertz, D.B., Bartlett, K., Blair, D. and Stern, C.M.M. Child with a defect in leucine metabolism associated with β -hydroxyisovaleric aciduria and β -methylcrotonylglycinuria. *Arch. Dis. Child.* 48:975-977 (1973).
60. Gordon, N., Marsden, H.B., Lewis, D.M. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in three siblings. *Dev. Med. Child. Neurol.* 16:64 (1974).
61. Grover, W.D., Averbach, V.H., Patel, M.S. Biochemical studies and therapy in subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh's syndrome). *J. Pediatr.* 81:39-44 (1972).
62. Guilbault, G.G. Fluorescence theory, instruments and practice. Marcel Dekker, Inc. New York (1967).
63. Guilbault, G.G. Practical Fluorescence theory, methods and techniques. Marcel Dekker, Inc. New York (1973).
- 63a. Guilbault, G.G. Enzymatic methods of analysis. First ed. Pergamon Press Inc. 1970.

64. Hansen, I.L., Levy, M.M. and Kerr, D.S. Differential diagnosis of hypoglycemia in children by responses to fasting and 2-deoxyglucose. *Metabolism* 32:960-970 (1983).
65. Hansen, I.L., Levy, M.M. and Kerr, D.S. Metabolic and hormonal responses of children and adolescents to fasting and 2-deoxyglucose. *Metabolism* 32:951-959 (1983).
66. Haslam, R.J. and Krebs, H.A. The metabolism of glutamate in homogenates and slices of brain cortex. *Biochem. J.* 88:566-577 (1963).
67. Haworth, J.C., Robinson, B.H. and Perry, T.L. Lactic acidosis due to pyruvate carboxylase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 4:57-58 (1981).
68. Haworth, J.C., Perry, T.L., Blass, J.P., Hansen, S. and Urquhart N. Lactic acidosis in three sibs due to defects in both pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase complexes. *Pediatrics* 58:564-572 (1976).
69. Haymond, M.W., Karl, I.E., Feigin, R.D., DeVivo, D. and Pagliara, A.S. Hypoglycemia and maple syrup urine disease: defective gluconeogenesis. *Pediatr. Res.* 7: 500-508 (1973).
70. Haymond, M.W., Karl, I.E., Clarke, W.L., Pagliara, A.S. and Santiago, J.V. Differences in circulating gluconeogenic substrates during shorter term fasting in men, women and children. *Metabolism* 31:33-42 (1982).

71. Haymond, M.W., Karl, I.E. and Pagliara, A.S. Ketotic - hypoglycemia: an amino acid substrate limited disorder. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38:521 (1974).
72. Henriksen, J.M., Nielsen, T.T. and Dahl, R. Effects - of physical training on plasma citrate and exercise-induced asthma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 41: - 225-229 (1981).
73. Hercules, D.M. (ed). Fluorescence and phosphorescence analysis. Principles and applications. John Wiley and Sons Inc. Interscience Publishers (1966).
74. Hercules, D.M. Some factors affecting fluorescence - maxima. *Science* 125:1242-1243 (1957).
75. Hillman, R.E., Keating, J.P. and Williams, J.C. Biotin responsive propionic acidemia presenting as the rumination syndrome. *J. Pediatrics* 92:439-440 (1978).
76. Holowach, J.T., Hauhart, R.E., Seltzer, J.L. and McDougal, D.B. Fluorometric determination of pyruvate and α -ketoglutarate in cerebrospinal fluid and plasma of infants and children. *Arch. Neurol.* 33:764-768 (1976).
77. Hommes, F.A., Polman, H.A. and Reerink, J.D. Leigh's encephalomyelopathy: an inborn error of gluconeogenesis. *Arch. Dis. Child.* 43:423-426 (1968).
78. Hommes, F.A., Schrijver, J. and Dias, T. Pyruvate carboxylase deficiency: studies on patients and an animal model system. In Burman D., Holton, J.B. and Pennock

- C.A. (eds.). Inherited disorders of carbohydrate - - metabolism. MTP, Lancaster (1980).
79. Hughes, E.A., Stevens, L.H. and Wilkinson, A.W. Some - aspects of starvation in the newborn baby. Arch. Dis. Child. 39:598 (1964).
 80. Johnson, J.L. Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous system. Brain Res. 37:1-19 (1972).
 81. Kalckar, H.M., Ullrey, D.B. and Laursen, R.A. Effects of combined glutamine and serum deprivation on glucose control of hexose transport in mammalian fibroblast cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:5958-5961 - (1980).
 82. Karl, I.E., Garber, A.J. and Kipnis, D.M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. I. Dietary and hormonal regulation. J. Biol. Chem. 251:844-850 (1976).
 83. Karl, I.E., Pagliara, A.S. and Kipnis, D.M. A microfluorometric enzymatic assay for the determination of - alanine and pyruvate in plasma and tissues. J. Lab. - Clin. Med. 80:434-441 (1972).
 84. Kerr, D.S., Stevens, M.C.G. and Picou, D.I.M. Fasting metabolism in infants: II The effect of severe under- nutrition and infusion of alanine on glucose produc - tion estimated with [U-¹³C]-glucose. Metabolism 27: - 831-848 (1978).

- 84a. Kerr, D.S., Stevens, M.C.G. and Robinson, H.M. Fasting metabolism in infants: I The effect of severe undernutrition on energy and protein utilization. *Metabolism* 27:411-435 (1978).
85. Kordan, H.A. Fluorescent contaminants from plastic and rubber laboratory equipment. *Science* 149:1382-1383 (1965).
86. Kosugi K., Harano, Y., Nakano, T., Suzuki, M., Kashiwagi A. and Shigeta, Y. Mechanism of adrenergic stimulation of hepatic ketogenesis. *Metabolism* 32:1081-1087 (1983).
87. Krebs, H.A., Hems, R., Lund, P., Halliday, D. and Read, W. W.C. Hepatic ammonia production. Mammalian urea synthesis. *Biochem. J.* 176:733-737 (1978).
88. Krebs, H.A., Woods, H.F., Alberti, K.G.M.M. Hyperlactaemia and lactic acidosis. *Essays med. Biochem.* 1:81-103 (1975).
89. Kreisberg, R.A. Glucose-lactate interrelations in man. *N. Eng. J. Med.* 287:132-137 (1972).
90. Kreisberg, R.A. Pathogenesis and management of lactic acidosis. *Ann. Rev. Med.* 35:181-193 (1984).
91. Kreisberg, R.A. Lactate homeostasis and lactate acidosis. *Ann. Intern. Med.* 92:227-237 (1980).
92. Kreisberg, R.A., Siegal, A.M. and Owen, W.C. Glucose--lactate interrelationships: effects of ethanol. *J. Clin. Invest.* 50:175 (1971).

- 92a. Kreisberg, R.A., Siegal, A.M., Owen, W.C. J. Clin. Endocrinol. 34:876-883 (1972).
93. Kruger, F.A., Carhart, J.M. and Austad, R.A. The glucose fatty acid cycle and the liver. J. Lab. Clin. Med. 64:876 (1964).
94. Laker, M.E. and Mayes, P.A. Biochem. J. 196:247-55 (1981).
95. Lee, Sung-Hee and Davis, E.J. Carboxylation and decarboxylation reactions. J. Biol. Chem. 254:420-450 (1979).
96. Lehninger, Albert. Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. 2a. Ed., Barcelona, 1980. Ed. Omega.
97. Liang, Chi-Chin. Studies on experimental thiamine deficiency. Trends of ketoacid formation and detection of glyoxylic acid. Biochem. J. 82: 429 (1962).
98. Lippert, H., Peter, H., Lehmann. S.I. Units in Medicine. An introduction to the internal system of units with conversation tables and normal ranges. Urban Schwarzenberg, Inc. Baltimore Munich, 1978.
99. Lowry, O.H. and Passonneau, J.V. A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York (1972).
- 99a. Lowry, O.H., Roberts, N.R. and Kapphahn, J.I. The fluorometric measurement of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem. 224: 1047-1064 (1957).

- 99b. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Schulz, D.W. and Rock, M.K. The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic - cyclizing. *J. Biol. Chem.* 236:2746-2755 (1961).
- 99c. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., and Rock, M.K. The - stability of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* - - 236:2756-2759 (1961).
100. Lund, P. L-Glutamine determination with glutaminase - and glutamate dehydrogenase. In Bergmeyer, H.U. (ed.). *Methods of enzymatic analysis.* Academic Press Inc., New York (1974).
101. Mackall, J.C. and Lane, M.D. Role of pyruvate carboxy - lase in fatty acid synthesis: alterations during pre-- adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. - - Commun.* 79:720-725 (1977).
102. MacMillan, V. and Siesjo, B.K. The influence of hypo-- capnia upon intracellular pH and upon some carbohydra - te substrates amino acids and organic phosphates in - the brain. *J. Neurochem.* 21:1283-1299 (1973).
103. Marks, V. A combined enzymatic method for measuring - α -oxoglutarate and pyruvate in blood and urine. *Clin. Chim. Acta* 6:724-729 (1961).
104. Marliss, E.B., Aoki, T.T., Pozefsky, T., Most, A.S. and Cahill, G.F. *J. Clin. Invest.* 50:814-817 (1971).
105. Masoro, E.J. Lipids and lipid metabolism. *Ann. Rev. Physiol.* 39:301-321 (1977).

106. Mayes, P.A. and Laker, M.E. Regulation of ketogenesis in the liver. *Biochem. Soc. Trans.* 9:339-341 (1981).
107. Mayes, P.A. and Felts, J.M. *Biochem. J.* 156:685-689 (1976).
108. Mayes, P.A. and Topping, D.L. *Biochem. J.* 140:111-114 (1974).
109. McGarry, J.D. and Foster, D.W. Regulation of ketogenesis and clinical aspects of the ketotic states. *Metab. Clin. Exp.* 21:471-489 (1972).
110. McGarry, J.D. and Foster, D.W. Regulation of hepatic - fatty acid oxidation and ketone body production. *Ann. Rev. Biochem.* 49:395-420 (1980).
111. McGarry, J.D., Boyd, M.E. and Foster, D.W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation in the rat during - - feeding and starvation. *Biochem. Soc. Trans.* 9:341 - (1981).
112. McGarry, J.D., Mannaerts, G.P. and Foster, D.W. *J. Clin. Invest.* 60:265-270 (1977).
113. McGarry, J.D., Meier, J.M. and Foster, D.W. *J. Biol. Chem.* 248:270-278 (1973).
114. McGarry, J.D., Wright, P.H. and Foster, D.W. *J. Clin. Invest.* 55:1202-1209 (1975).
115. Meister, A., Tate, S.S. Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.* 45:559-604 (1976).

116. Mellanby, J. and Williamson, D.H. Acetoacetate. In - Bergmeyer, H.U. (ed.). Methods of enzymatic analysis Academic Press Inc., New York (1974).
117. Mock, D.M., DeLorimer, A.A., Liebman, W.M., Sweetman, L. and Baker, H. Biotin deficiency: an unusual complication of parenteral alimentation. N. Engl. J. Med. 304:820-823 (1981).
118. Montgomery, R., Dryer, R.L., Conway, T.W. and Spector, A. A. Bioquímica Médica. Salvat Editores, S.A. Barcelona, (1980).
119. Moore, W.J. Physical Chemistry. Prentice-Hall, INC. Englewood Cliffs, New Jersey 4o. ed. (1972).
120. Murphy, J.V., Isohashi, F., Weinberg, M.B. and Utter, M. F. Pyruvate carboxylase deficiency: an alleged biochemical cause of Leigh's disease. Pediatrics 68:401-404 (1981).
121. Nasseem, S.M., Khan, M.A., Jacobson, M.S., Nair, P.P. and Heald, F.P. The influence of dietary cholesterol and fat on the homeostasis of cholesterol metabolism in early life in the rat. Pediatr. Res. 14:1061-1066 (1980).
- 121a. Netheler, H. Absorption Photometry. In Bergmeyer, H. - U., and Gawehn, K. (eds.). Principles of enzymatic - analysis. Verlag Chemie. Weinheim. New York. 1978.
122. Nielsen, T.T. Plasma citrate during submaximal and - intermittent supramaximal exercise. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 38:29-33 (1978).

123. Nielsen, T.T. and Sørensen, N.S. Daily plasma citrate rhythms in man during feeding and fasting. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 41:281-287 (1981).
124. Nielsen, T.T. and Sørensen, N.S. Citrate in plasma and urine during total fasting. *Acta med. Scand.* 205:303 - (1979).
125. Nielsen, T.T. and Thomsen, P.E.B. Leg and splanchnic arteriovenous differences of plasma citrate in exercising man. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. - Exercise Physiol.* 46:120 (1979).
126. Noll, F. Lactate's quantitative determination. In - Bergmeyer, H.U. (ed.). *Methods of enzymatic analysis.* Academic Press Inc., New York (1974).
127. Nosadini, R., Datta, H., Hodson, A. and Alberti, K.G.M.M. A possible mechanism for the anti-ketogenic - - action of alanine in the rat. *Biochem. J.* 190:323-332 (1980).
128. Nosadini, R., McCulloch, A., Del Prato, S., Avogaro, A. - and Alberti, K.G.M.M. The relationship between alanine and ketone bodies in vivo. *Metabolism* 31:1175-1178 (1982).
129. Numa, S. Dual roles of long-chain acyl-coenzyme A in - the regulation of acetyl-coenzyme A carboxylase. - *Biochem. Soc. Trans.* 9:9-12 (1981).
130. O'Donnell, T.F., Clowes, G.H.A., Blackburn, G.L., Ryan, N.T., Benotti, P.N. and Miller, J.D.B. Proteolysis - associated with a deficit of peripheral energy fuel -

- substrates in septic man. *Surgery* 80:192-200 (1976).
131. Orringer, C.E., Eustace, J.C., Wunsch, C.D., Gardner, L.B. Natural history of lactic acidosis after grand - mal seizures. *N. Engl. J. Med.* 297:796-799 (1977).
 132. Osnes, J.B., Hermanse, L. Acid-base balance after - maximal exercise of short duration. *J. Appl. Physiol.* 32:59-63 (1972).
 133. Owen, O.E., Felig, P., Morgan, A.P., Wahren, J. and - Cahill, G.E. Liver and kidney metabolism during prolon - ged starvation. *J. Clin. Invest.* 48:574-583 (1969).
 134. Owen, O.E., Morgan, A.P. Keny, H.G., Sullivan, J.M., Herrera, M.G. and Cahill, G.F. Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* 46:1589-1595 (1967).
 135. Owen, O.E. and Schramm Vern, L. Lipid metabolism - - during starvation: hepatic energy balance and ketogene - sis. *Biochem. Soc. Trans.* 9:342-344 (1981).
 136. Packman, S., Sweetman, L. and Wall, S. Biotin respon - sive multiple carboxylase deficiency in a child with - congenital lactic acidosis. *Am. J. Hum. Genet.* 31:58 (1979).
 137. Parker, C.A. Direct recording of fluorescence excita - tion spectra. *Nature* 182:1002-1004 (1958).
 138. Parrilla, R., Jimenez, M.I. and Ayuso-Parrilla, M.S. Cellular redistribution of metabolites during glucagon and insulin control of gluconeogenesis in the isolated perfused rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 174:1-12 - (1976).

139. Patel, T.B., Debuysere, M.S., Scholz, R. and Olson, M.S. The regulation of the pyruvate dehydrogenase complex in the perfused rat liver: A role for the mitochondrial - monocarboxylate translocator. *Arch. Biochem. Biophys.* 213:573-584 (1982).
140. Persson, B. and Gentz, J. The pattern of blood lipids, glycerol and ketone bodies during the neonatal period - infancy and childhood. *Acta Paediat. Scand.* 55:353-362 (1966).
141. Powanda, M.C. and Canonico, P.G. (eds.). *Infection: The physiologic and metabolic responses of the host*. Elsevier /North Holland, Amsterdam (1981).
142. Prusiner, S.B. Disorders of glutamate metabolism and -- neurological dysfunction. *Ann. Rev. Med.* 32:521-542 (1981).
143. Rajantie, J. Orotic aciduria in lysinuric protein into larence: Dependence on the urea cycle intermediates. -- *Pediatr. Res.* 15:115-119 (1981).
144. Reitzer, L.J., Wice, B.M. and Kennell, D. Evidence that glutamine, not sugar, in the major energy source for -- cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254:2669-2676 - - (1979).
145. Reitzer, L.J., Wice, B.M. and Kennell, D. The pentose cycle. Control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 355:5616-5626 (1980).
146. Robert, J.J., Bier, D.M., Zhao, X.H., Matthews, D.E. --

- and Young, V.R. Glucose and insulin effects on de novo amino acid synthesis in young men; studies with stable isotope labeled alanine, glycine, leucine and lysine. - *Metabolism* 31:1210-1217 (1982).
147. Roberts, E., Chase, T., Towers, D. (eds.). GABA in nervous system function. New York: Raven (1976).
148. Robinson, B.H., Taylor, J. and Sherwood, W.G. The genetic heterogeneity of lactic acidosis: occurrence of - - recognizable inborn errors of metabolism in a pediatric population with lactic acidosis. *Pediatr. Res.* 14:956-962 (1980).
149. Rognum, T.O., Waage, A., Hostmak, A. and Opstad, P.K. - Metabolic responses to bicycle exercise after several days of physical work and energy deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 41:565-571 (1981).
150. Rolleston, F.S. and Newsholme, E.A. Effects of fatty acids, ketone bodies, lactate and pyruvate on glucose - utilization by guinea-pig cerebral cortex slices. *Biochem. J.* 104:519-523 (1967).
- 150a. Rosenberg, L.E. Inborn Errors of Metabolism. In Bondy, P.K., Rosenberg, L.E. (eds.). *Duncan's Disease of Metabolism*. W.B. Saunders Co. 7o. ed. 1974.
151. Roth, K.S., Yang, W., Foreman, J.W., Rothman, R. and -- Segal, S. Holocarboxylase synthetase deficiency: A - - biotin responsive organic acidemia. *J. Pediatr.* 96: 845-849 (1980).

152. Safer, B. and Williamson, J.R. Mitochondrial-cytosolic interactions in perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* 7: 2570-2579 (1973).
153. Saggerson, E.D., Sooranna, S.R. and Harper, R.D. Hormones and fatty acid metabolism in white adipose tissue. *Biochem. Soc. Trans.* :900-903 (1976).
154. Sandek, C.D., and Felig, P. The metabolic events of starvation. *Am. J. Med.* 60:117-126 (1976).
155. Saudubray, J.M., Marsac, C., Charpentier, C., Leaud, M. B., Cathelineau, L. and Leroux, J.P. Neonatal congenital lactic acidosis with pyruvate carboxylase deficiency in two siblings. *Acta Paediatr. Scand.* 65:717-724 - - (1976).
156. Saunders, M., Sweetman, L., Robinson, B. Roth, K., - - Cohn, R. and Gravel, R.A. Biotin-responsive organic aciduria: Multiple carboxylase defects and complementation studies with propionic acidemia in cultured fibroblast. *J. Clin. Invest.* 64:1695-1702 (1979).
157. Scheinberg, P. Observations on cerebral carbohydrate metabolism in man. *Ann. Intern. Med.* 62:367-371 - - (1965).
158. Scrutton, M.C. and White, M.D. Purification and properties of human liver pyruvate carboxylase. *Biochem. Med.* 9:271-292 (1974).
159. Scrutton, M.C. and White, M.D. Pyruvate carboxylase. Inhibition of the mammalian and avian liver enzymes by

- α -ketoglutarate and L-glutamate. *J. Biol. Chem.* 249: 5405-5415 (1974).
160. Selleck, B., Cohen, J.J. and Randall, H.M. Enzymic assay of α -ketoglutarate in dog blood, plasma, urine and tissue. *Anal. Biochem.* 7:178-188 (1964).
161. Settergren, G., Persson, B. and Dahlquist, G. The effect of moderate hypocapnia on the cerebral arteriovenous difference of acetoacetate, D- β -Hydroxybutyrate and oxygen in children. *Acta Paediat. Scand.* 62: 141 (1973).
162. Shapiro, B. Lipid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 36:247-265 (1967).
163. Sharma, R.J., Rodriguez, L.M., Whitton, P.D. and Hems, D.A. Control mechanism in the acceleration of hepatic glycogen degradation during hypoxia. *Biochim. Biophys. Acta* 630:414-424 (1980).
164. Shih, V.E. Urea cycle disorders and other congenital hyperammonemic syndromes. In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Fredrickson, D.S. (eds.). *The metabolic basis of inherited disease*. New York, McGraw-Hill (1978).
165. Snodgrass, P.J. Biochemical aspects of urea cycle disorders. *Pediatrics* 68:273-297 (1981).
166. Sokoloff, L. Metabolism of ketone bodies by the brain. *Ann. Rev. Med.* 24:271-288 (1973).

167. Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S. - Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (eds.). The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, New York So. ed. (1983).
168. Stanley, C.A. and Backer, L. Hyperinsulinism in infancy: diagnosis by demonstration of abnormal responses to fasting hypoglycemia. *Pediatrics* 57:7 (1976).
169. Stewart, R.M., Hemli, S., Kolodny, E.H., Miller, A.L. and Pallota, J.A. Carbohydrate metabolism in phenylketonuria. *Pediatr. Res.* 14:849-853 (1980).
170. Stumpf, D.A. and Parks, J.K. Urea cycle regulation: - I. Coupling of ornithine metabolism to mitochondrial - oxidative phosphorylation. *Neurology* 30:178-184 - - (1980).
171. Sumbilla, C.M., Zielke, C.L., Reed, W.D., Ozand, P.T. and Zielke, H.R. Comparison of the oxidation of glutamine, glucose, ketone bodies and fatty acids by human diploid fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 675: 149 (1981).
172. Sweetman, L., Bates, S.P., Hull, D. and Nyhan, W.L. - Propionyl-CoA carboxylase deficiency in a patient - - with biotin-responsive 3-methylcrotonylglycinuria. *Pediatr. Res.* 11:1144-1147 (1977).
173. Sweetman, L., Nyhan, W.L., Trauner, D.A., Merrit, T.A. and Singh, M. Glutaric aciduria type II. *J. Pediatr.* - 96:1020-1026 (1980).

174. Sweetman, L., Surh, L., Baker, H., Peterson, R.M. and Nyhan, W.L. Clinical and metabolic abnormalities in a boy with dietary deficiency of biotin. *Pediatrics* 68:553-558 (1981).
175. Tada, K., Sugita, K., Fujikawi, K., Kesaki, T., Takada, G. and Omura, K. Hyperalaninemia with pyruvicemia in a patient suggestive of Leigh's encephalomyelopathy. - *Tohoku. K. Exp. Med.* 109:13 (1973).
176. Thoene, J., Baker, H., Yoshino, M. and Sweetman, L. - Biotin-responsive carboxylase deficiency associated - - with subnormal plasma and urinary biotin. *N. Engl. J. Med.* 34:817-820 (1981).
177. Tyler, B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47:1127-1162 (1978).
178. Udenfried, S. Fluorescence assay in biology and medicine. Vol. I. Academic Press, New York (1964).
179. Udenfried, S. Fluorescence assay in biology and medicine. Vol. II. Academic Press, New York (1970).
180. Umbarger, H.E. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 47:533-606 (1978).
181. Utter, M.F. and Keech, D.B. Pyruvate carboxylase. - - Part I. Nature of the reaction. *J. Biol. Chem.* 238: - 2603-2608 (1963).
182. Van Biervliet, J.P.G.M., Bruinvis, L., Van Der Heiden, C., Ketting, D., Wadman, S.K., Willemsse, J.L. and - -

- Monnens, L.A.H. Report of a patient with severe - - - chronic lactic acidemia and pyruvate carboxylase deficiency. *Dev. Med. Child. Neurol.* 19:392-401 (1977).
183. Velázquez, A., Montiel, F., Shaw Kenneth, N.F., Carnevale, A. y Del Castillo, V., Enfermedad de orina de jarabe de arce: Heterogeneidad genética, diagnóstico -- de heterocigotos y un nuevo enfoque terapéutico. *Rev. Invest. Clin. (Méx.)* 53:273-279 (1981).
- 183a. Velázquez, A. Experiencias en la prevención y tratamiento de los errores innatos del metabolismo. En - - Martuscelli, J.; Soberón, G. y Palacios, R. (eds.). - Caminos de la Biología Fundamental. Dir. Gral. de Publicaciones de la U.N.A.M. México, 1984.
184. Waelsch, H. Glutamic acid and cerebral function. *Adv. Protein Chem.* 6:299-341 (1951).
185. Waelsch, H. In Brucke, F. *Biochemistry of the Nervous System. Proc. 4th Internatl. Congress Biochemistry*, - Pergamon Press, London (1959).
186. Waelsch, H. In Tower, D.B. and Shcadé, J.P. *Structure and function of the cerebral cortex. Elsevier Publishing Co, Amsterdam* (1960).
187. Wahren, J., Hagenfeldt, L., Felig, P. Splanchnic and - leg exchange of glucose, amino acids, and free fatty - acids during exercise in diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 55:1303-1314 (1975).
188. Walter, P., Paetkau, V. and Lardy, H.A. Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. *J. Biol. Chem.* 241:2523-2532 (1966).

189. Wannemacher, R.W., Pace, J.G., Beall, F.A., Dinterman, R.E., Petrella, V.J. and Neufeld, H.A. Role of the liver in regulation of ketone body production during sepsis. *J. Clin. Invest.* 64:1565-1572 (1979).
190. Wellner, D. and Meister, A. A survey of inborn errors of amino acid metabolism and transport in man. *Ann. Rev. Biochem.* 50:911-968 (1981).
191. Weyler, W., Swettman, L., Maggio, D.C. and Nyhan, W.L. Deficiency of propionyl-CoA carboxylase and methylcrotonyl-CoA carboxylase in a patient with methylcrotonyl glycinuria. *Clin. Chim. Acta* 76:321-328 (1977).
192. White, A., P. Handler and E.L. Smith. *Principles of Biochemistry.* McGraw-Hill, New York 5o. ed. (1973).
193. Wieland, O., Evertz-Prüsse, E. and Stukowski, B. Distribution of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in human liver. *FEBS Lett.* 2:26 (1968).
194. Williams., R.T. and Bridges, J.W. Fluorescence as an analytical technique in clinical biochemistry and pathology. *J. Clin. Path.* 17:371-391 (1964).
195. Williamson, D.H. Recent developments in ketone body metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 7:1313-1321 (1979).
196. Williamson, D.H. Utilization of ketone bodies by mammalian tissues. *Biochem. Soc. Trans.* 9:346-347 (1981).

197. Williamson, D.H., Mellanby, J. and Krebs, H.A. Enzymatic determination of D(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem. J.* 82:90 (1962).
198. Williamson, D.H. and Whitelaw, E. *Abstr. FEBS. Symp.* 11th 42:151-160 (1978).
199. Williamson, D.H., Bates, M.W., Page, M.A., Krebs, H.A. *Biochem. J.* 121:41-47 (1971).
200. Williamson, D.H., Veloso, D., Ellington, E.V. and Krebs, H.A. *Biochem. J.* 114:575-584 (1969).
201. Winefordner, J.D., McCarthy, W.J. and St. John, P.A. Phosphorimetry as an analytical approach in biochemistry. In Glick D. (ed.). *Methods of Biochemical Analysis*. Interscience Publishers. John Wiley & Sons, New York (1967).
202. Wolf, B., Hsia, Y.E. and Rosenberg, L.E. Biochemical differences between mutant propionyl-CoA carboxylases from two complementation groups. *Am. J. Hum. Genet.* 30:455-464 (1978).
203. Wolf, B., Hsia, Y.E., Boychuk, R. et al. In vivo enzyme activation by biotin of multiple carboxylase deficiency in a neonate. *Pediatr. Res.* 14:529 (1980).
204. Wolf, B., Hsia, Y.E., B.M., M.R.C.P., Sweetman, L., Feldman, G., Boychuk, R.B., Bart, R.D., Crowell, D., Di Mauro, R.M. and Nyhan, W.L. Multiple carboxylase deficiency: Clinical and biochemical improvement following neonatal biotin treatment. *Pediatrics* 68:113-118 (1981).

205. Wolf, B., and Rosenberg, L.E. Stimulation of propionyl CoA and β -methylcrotonyl-CoA carboxylase activities in human leukocytes and cultured fibroblasts by biotin. *Pediatr. Res.* 13:1275-1279 (1979).
206. Wood, H.G., Barden, R.E. Biotin enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 46:385-413 (1977).
207. Wright, E. and Hughes, R.E. Dietary citric acid. *Nutrition* 29:367 (1975).
208. Yoshida, T., Tada, K., Konno, T. And Arakawa, T. Hyperalaninemia with pyruvicemia due to pyruvate carboxylase deficiency of the liver. *Tohoku J. Exp. Med.* 99: 121-128 (1969).
209. Young, D.A.B. and Renold, A.E. A fluorometric procedure for the determination of ketone bodies in very small quantities of blood. *Clin. Chim. Acta* 13:791-793 (1966).
210. Zammit, V.A. Intrahepatic regulation of ketogenesis - *Trends. Biochem. Sci.* 6:46-49 (1981).
211. Zammit, V.A. Regulation of hepatic fatty acid metabolism. *Biochem. J.* 198:75-83 (1981).
212. Zammit, V.A., Beis, A. and Newsholme, E.A. *FEBS Letts.* 103:212-215 (1979).
213. Zammit, V.A. *Biochem. J.* 190:293-300 (1980).

214. Zeilke, H.R., Ozand, P.T., Tildon, J.T., Sevdalinn D.A. and Cornblath, M. Growth of human diploid fibroblasts in the absence of glucose utilization. Proc. Natl. Acad. Sci. 73:4110-4114 (1976).
215. Zwiebel, F.M., Schwabe, U., Olson, M.S. and Scholz, R. Role of pyruvate transporter in the regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex in perfused rat liver. Biochemistry 21:346-353 (1982).
216. Ackermann, P.G. Clin. Chem. 10:32(1964).
217. Arinze, J.C. and Mistry, S.P. Activities of some biotin enzymes and certain aspects of gluconeogenesis during biotin deficiency. Comp. Biochem. Physiol. 38B: 285-294 (1971).
218. Bas, S., Favargen, P. and Rous, S. Regulation of pyruvate carboxylase activity by pyruvate in mice liver. - Inv. J. Biochem. 10:117-124 (1979).
219. Beard, R.W., Turner, R.C. and Oakley, N.W. Fetal response to glucose loading. In Hodare A.A. and Mariona F. G. (eds.). Physiological Biochemistry of the fetus. Charles C. Thomas, Springfield (1972).
220. Berger, M., Zimmerman-Telschow, H. and Peter, B. - - Blood amino acid levels in patients with insulin excess (functioning insulinoma) and insulin deficiency (diabetic ketosis). Metabolism 27:7 (1978)
221. Bjorntorp and Sjostrom, L. Carbohydrate storage in man: speculation and some quantitative considerations. Metabolism 26:77 (1977).

222. Cazzulo, J.J., Sundaram, T.K. and Kornberg, H.L. - - Mechanism of pyruvate carboxylase formation from the apoenzyme and biotin in a thermophilic bacillus. *Nature* 227:1103 (1970).
223. Cohen, R.D. and Woods, H.F. Lactic acidosis revisited. *Diabetes* 32:181-191 (1983).
224. Hue, L., Feliu, J.E. and Hers, Henri-Géry. Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 176:791-797 (1978).
225. Metzger, B.A., Hunger, R.H. and Frimkel, N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. XIV Relationship between circulating glucagon, insulin, glucose and amino acids in response to a "mixed meal" in late pregnancy. *Metabolism* 26:151 (1977).
226. Mora, J. and Palacios, R. (eds.). Glutamine, metabolism, enzymology and regulation. Academic Press Inc. New York (1980).
227. Newsholme, E.A. and Start, C. (eds.). Regulation in metabolism. Wiley & Sons. London (1974).
228. Newsholme, E.A. and Crabtree, B. *Biochem. Soc. Symp.* 41:61-110 (1976).
229. Newsholme, E.A. and Crabtree, B. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27:429-460 (1973).
230. Park, R. and Arieff, A.I. Lactic acidosis, *Adv. Intern. Med.* 25:33-67 (1980).

231. Perry, Tl. and Hansen, S. Clin. Chim. Acta 25:53 -- (1969).
232. Persson, B. Carbohydrate and lipid metabolism in the newborn. Acta Chir. Scand. 498:56-60 (1980).
233. Scriver, Cr. and Davies, E. Pediatr. 36:592 (1965).
234. Sonnernberg, G.E. and Keller, U. Sampling of arteria--lized heated-hand venous blood as a non-invasive technique for the study of ketone body kinetics in man. - Metabolism 31 (vol. 1), 1982.
- 234a. Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., -- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. Inborn errors of me--tabolism in the 1980s. In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldsten, J.L. and Brown, - M.S. (eds.). The metabolic basis of inherited disea--se. McGraw-Hill, New York 5o. ed. (1983).
235. Tang, T.T., Good, T.A., Dyken, P.R., Johnson, S.D., - McCreddie, S.R., Sy, S.T., Lardy, H.A. and Rudolph, F. B. Pathogenesis of leigh's encephalomyelopathy. J. - Pediatr. 81:189-190 (1972).
236. Warren, G.B. and Tipton, K.F. Pig liver pyruvate car--boxylase. Biochem. J. 139:297-310 (1974).
237. Williamson, D.H. and Mellanby, J. D-(3)-Hydroxybuty--rate. In Bergmeyer, H.U. (ed.). Methods of enzymatic - analysis. Vol. 4, 2nd. English ed. Academic Press, New York (1974).

238. Williamson, D.H. Alanine. In Bergmeyer, H.U. (ed.).--
Methods of enzymatic analysis. Vol. 4, 2nd. English -
ed. Academic Press, New York (1974).
239. White, C.A., Argauer, R.J. Fluorescence analysis, a -
practical approach. Marcel Dekker, New York (1970).