



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**[EL ÁCIDO D-AMINO LEVULÍNICO: VALORACIÓN E IMPORTANCIA]**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**HERNÁNDEZ MONTENEGRO, LUIS ROGELIO**

ASESOR: ENRIQUE VILLARREAL DOMÍNGUEZ

Ciudad Universitaria, México, D. F.

1968



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO :

PRESIDENTE	<u>Prof. JOSE SHAREZ ISLA</u>
VOCAL	<u>Prof. ENRIQUE VILLAREAL D.</u>
SECRETARIO	<u>Srita. Prof. GUADALUPE VELEZ PRATT</u>
1º SUPLENTE	<u>Prof. CARLOS DEL RIO ESTRADA</u>
2º SUPLENTE	<u>Prof. ALEJANDRO BLANCO LABRA</u>

SITIOS DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

"Instituto de Investigaciones Biomédicas" - UNAM y  
Laboratorio de Físico-Química y Análisis Instrumental,  
Facultad de Química , UNAM .

SUSTENTANTE .....  
LUIS ROGELIO HERNANDEZ MONTENEGRO

ASESOR DEL TEMA .....  
Ing. Q. ENRIQUE VILLAREAL DOMINGUEZ

**"La siembra de la ciencia  
germinará para la siega del pueblo".**

**MENDELBEV**

**A Virginia,**

**Compañera en la profesión  
y ejemplar esposa.**

## A G R A D E C I M I E N T O

El presente estudio fué sugerido por los doctores Dionisio Nieto y José Luis Díaz, investigadores del actual "Instituto de Estudios Biomédicos", en cuyos laboratorios se realizó parte del trabajo. Deseo expresarles mi agradecimiento, el cual hago extensivo a todo el personal del Instituto. De igual manera agradezco al maestro Enrique Villareal D. y a la maestra Guadalupe Alonso, quienes nos facilitaron recursos instrumentales y su valioso consejo.

## INTRODUCCION

La idea que anima el presente estudio, no es simplemente la de desarrollar un método analítico más; nos interesa también, en relación con su aplicabilidad en el estudio de la bioquímica de algunos trastornos, metabólicos y mentales. En efecto, el ácido  $\alpha$ -amino levulínico - cuya valoración es objeto central de ésta tesis - es un metabolito que despierta gran interés por ser precursor de compuestos tan importantes como la protoporfirina IX, la vitamina B-12 y el ácido adenílico (AMP); el AAL es una de las dos alfa amino-cetonas encontradas en el hombre; también se encuentra en animales y en bacterias; normalmente se excreta por la orina humana en cantidad de 2 - 3 mg / 24 hs. Esta tasa de excreción se encuentra notablemente elevada en los enfermos de porfiria aguda intermitente y en los casos de envenenamiento por Plomo.

En los últimos años, los Gajdos en Francia y el Dr. Nieto, del Instituto de Estudios Biomédicos, han estudiado la acción terapéutica del AMP, el primero en casos de porfiria; el segundo en esquizofrénicos. Los magníficos resultados que se han obtenido, son el precedente inmediato de nuestro interés por el AAL, como precursor del AMP.

Lo que hasta el presente se conoce del AAL es muy poco, en comparación con lo que se ignora. El poseer métodos precisos para valorarlo es un requisito indispensable para aumentar ese conocimiento. Profundamente interesados en la bio-

química de las enfermedades mentales, única vía para explicarlas, hemos querido contribuir con ese primer eslabón.

Nuestro estudio comprende :

1. Una descripción del metabolismo del AAL y su posible relación con los trastornos mentales.
2. Una descripción crítica de los métodos de valorar el AAL
3. El establecimiento de las condiciones más adecuadas para valorar el AAL por el método del picrato alcalino, previa eliminación del Porfobilinógeno, que interfiere la determinación.
4. La determinación de los valores normales de excreción de AAL en orina, utilizando 18 sujetos.
5. El establecimiento de curvas, posiblemente circadianas, de excreción de AAL normales y en dos sujetos bajo el efecto de fármacos.
6. Descripción del método a seguir en sangre y en tejidos.
7. Por último, presentamos nuestras conclusiones y proponemos algunas experiencias básicas para fundamentar la hipótesis de que el AAL está alterado en la esquizofrenia.

La imposibilidad de realizar el experimento crucial, por falta de tiempo y posibilidades técnicas la excusamos con la esperanza de poder realizar posteriormente las determinaciones que aquí sugerimos, los cuales tal vez signifiquen una vez realizados, una auténtica contribución. De momento, diremos con Henri Poincaré que ... "La parte de colaboración personal de un hombre en la creación del hecho científico es solamente el error" .

## PROPIEDADES Y METABOLISMO DEL ACIDO d-AMINO LEVULINICO

En 1953 descubrió D. Shemin (22) un d-aminoacido, que era a la vez una alfa-amino-cetona :



P.M. base libre : 131

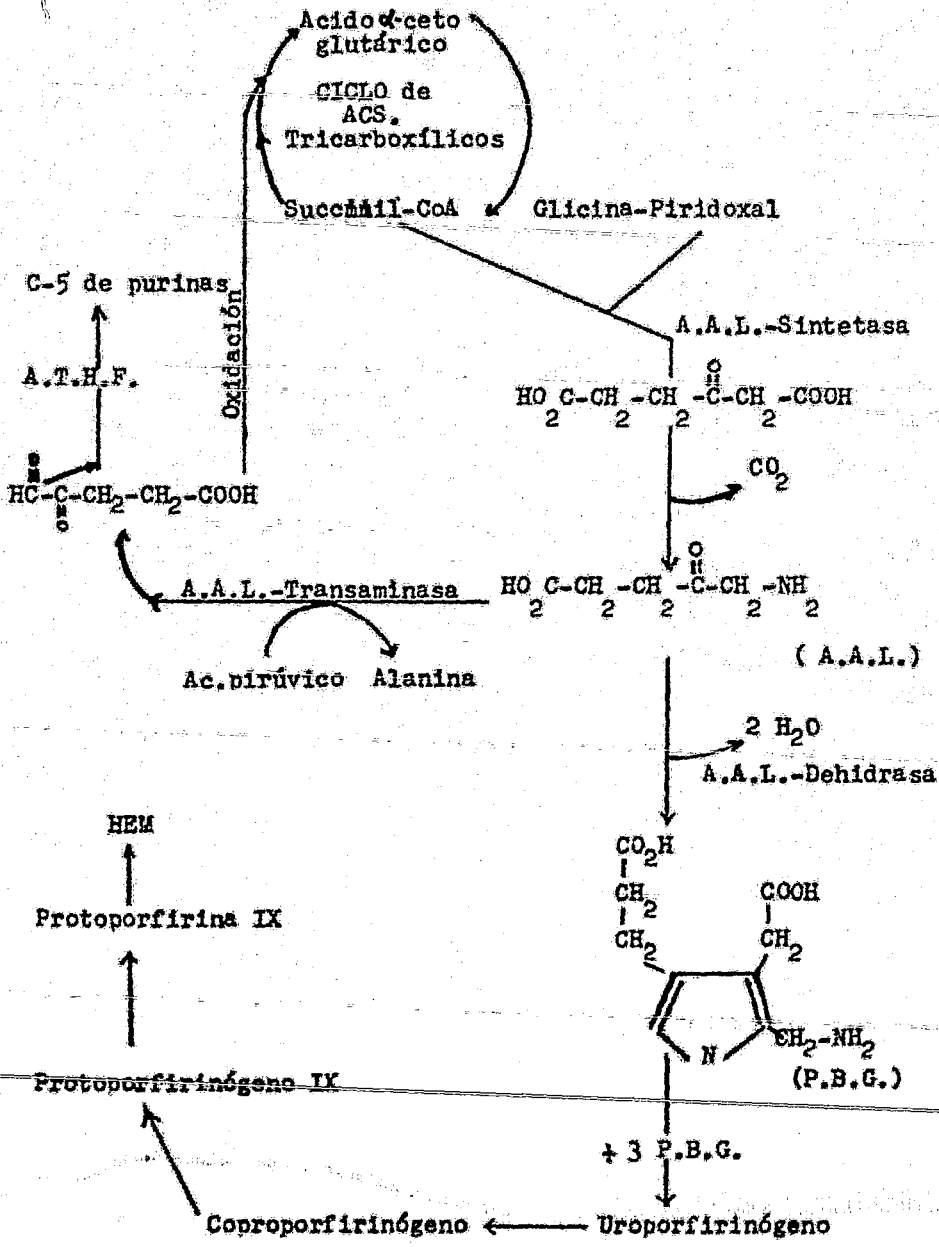
P.M. Clorhidrato: 167.5

P.F. " " " : 146°C.

Este ácido: 4-ceto,5-amino-valérico, recibió el nombre de delta (0 5) amino-levulínico, por derivación del ácido levulínico, conocido producto del calentamiento de la fructosa. A partir de su descubrimiento se iniciaron estudios destinados a dilucidar su papel bioquímico y se logró establecer que constituye un metabolito, sito en la encrucijada de dos ciclos de gran interes: el de las porfirinas y el de las bases púricas. En la pag. siguiente se esquematiza el ciclo llamado de glicina-succinato, junto con la desviación hacia la síntesis de purinas. La disposición del ciclo es original nuestra. Como puede seguirse en dicho esquema, el ácido d-amino levulínico (AAL) procede de la reacción entre una molécula de glicina activada por el piridoxal y una molécula de ac. succínico, también activado (succinil-CoA). El producto directo de la reacción es el ácido alfa-amino, beta-ceto, alfa-ceto, que se descarboxila dando el AAL.

Este ácido así formado, puede sufrir una reacción de condensación tipo Knorr, dando lugar a la formación del porfobilin -

METABOLISMO DEL A.A.L.



nógeno (PBG). Cuatro moléculas de PBG constituyen el tetrapirrol fundamental de las porfirinas: el protoporfirinógeno, que tras posteriores transformaciones entrará a formar parte de la Hemoglobina y de mioglobina, catalasa, peroxidasa y citocromos.

Pero también puede el AAL, por transaminación dar lugar a la formación de aldehído alfa-ceto glutárico, el cual libera un grupo formato, que mediante el ATP, pasa a constituir el carbono 5 de las bases púricas. El AAL no es la fuente exclusiva de restos de un carbono para la síntesis de purinas, pues se sabe que los grupos formilo pueden provenir de otros orígenes, constituyendo de hecho una poza metabólica, pero por esta vía, el C-alfa de la glicina, que pasó a constituir el C-delta en el AAL, termina constituyendo el C-5 de purinas.

Tres enzimas fundamentales llaman la atención en estos ciclos: 1) La AAL-sintetasa, enzima necesaria para que se verifique la primera reacción, de la glicina con el succinato. Requiere a su vez la presencia de fosfato de piridoxal, de Coenzima A, ácido lipóico y GDP, como sucede en casi todas las reacciones que involucran una descarboxilación. Esta enzima está localizada en las mitocondrias (Gajdos, 1959) (9 y 14), su pH óptimo es de 6.9 y sus grupos activos son sulfhidrilos, según lo indica el que sea inhibida por la yodoacetamida y se reactive con glutatión o con cisteína.

2). La AAL - dehidrasa, que es la enzima necesaria para la condensación del AAL consigo mismo para dar PBG. Al contrario de la anterior, ésta enzima se localiza en la fase acuosa de la célula. Inicialmente fué aislada de hígado de buey, pero luego se ha encontrado en eritrocitos de pato y de pollo, hígado de conejo, hojas de espinaca, etc. Los únicos organismos que al parecer carecen de ésta enzima son las levaduras. La enzima tiene gran interés porque cataliza dos reacciones químicamente diferentes: entre un metileno y un carbonilo y entre un grupo de amina primaria y un carbonilo. Contiene también grupos -SH y contiene Cu, por lo cual es inhibida por el EDTA.

3). La AAL- transaminasa, que transforma el AAL en semialdehído alfa-oxiglutarico, en presencia de ac. pirúvico como aceptor del grupo amino. Sobre la importancia de ésta enzima se hace hincapié más adelante.

El AAL se encuentra además ligado en su metabolismo al ciclo de los ácidos tricarbóxicos; todos los constituyentes del ciclo en presencia de glicina pueden servir de substrato para la síntesis del AAL, aunque con distinto rendimiento. (3). El más efectivo es el isocitrato y no precisamente el succinato. Los inhibidores del ciclo de Krebs (ac. malónico, fluorocitrato, parapi-ruvato, etc.), inhiben por lo tanto, la síntesis del AAL.

También está relacionado el AAL con la biosíntesis de la vitamina B-12, como lo han demostrado Bray y col. (2). La estructura pirrólica básica de la vitamina (estructura de Corrin), se origina en forma semejante a la de las porfirinas.

## RELACION DEL AAL CON LAS ENFERMEDADES MENTALES .

Desde hace muchos años, los bioquímicos han tratado de establecer la presencia de alguna alteración metabólica en los transtornos mentales. Aunque aún no se ha encontrado una alteración sistemática, existe la convicción de que tal debe existir, pues la psicología tradicional no basta para explicar la naturaleza de tales transtornos; de hecho, en algunos casos se ha logrado ya precisar en términos bioquímicos la causa de algunas enfermedades de la conducta p.e. en la oligofrenia fenilpirúvica, error congénito del metabolismo, se sabe que la carencia de una enzima determina el retardo mental característico de la enfermedad. Pero en el caso de la esquizofrenia, ninguna hipótesis ha sido plenamente comprobada.

Hace algunos años se mostró gran interés por la serotonina como posible metabolito alterado en la esquizofrenia. Sustentaban ésta hipótesis algunos hechos, entre ellos :

- a) Análogos estructurales de la serotonina, como la dietilamida del ácido lisérgico, pueden provocar en personas normales, síntomas esquizofrénicos.
- b) Drogas tranquilizadoras como la reserpina, disminuyen la concentración de serotonina en el cerebro; otras como la Clorpromazina interfieren la acción de la serotonina sobre tejidos.
- c) ~~Algunas drogas depresoras incrementan el nivel de serotonina; si por algún método se incrementa éste nivel en cerebro en pacientes esquizofrénicos, su estado empeora.~~

Una discusión más detallada de la relación entre serotonina y esquizofrenia, así como de otras hipótesis bioquímicas, se encuentra en la ref. (29). La hipótesis de la serotonina no ha sido congruente con experimentos posteriores, y tal vez no refleje el disturbio esencial. En años más recientes, algunas observaciones clínicas y experimentales han hecho pensar en otros metabolitos, entre ellos el AAL. Revisemos enseguida los fundamentos de la hipótesis que relaciona el AAL con los trastornos psiquiátricos.

1). La porfiria, enfermedad que Gajdos(10) define como una: "afección caracterizada por trastornos metabólicos cualitativos o cuantitativos de las porfirinas, asociados por lo menos a uno de los síntomas esenciales - abdominales, nerviosos, cutáneos - o que ocurren en un sujeto perteneciente a una familia con casos de porfiria conocidos"(p.1231) , es una enfermedad de baja incidencia(1.5 por cada 100,000 htes.) pero de gran interés bioquímico, pues en ella encontramos una tasa elevada de porfirinas excretadas por la orina, alteración que desde el punto de vista teórico puede deberse bien sea a una incapacidad para transformarlas en hem o bien a una exagerada síntesis de ellas. Las experiencias han permitido aclarar que el trastorno reside a nivel de la sintetasa del AAL en el hígado(18,19) En efecto, si se administra un agente causal de porfiria experimental p.e. la alil-isopropil-acetamida, la griseofulvina, etc. se puede lograr un incremento de la actividad de la sintetasa

hasta 7 veces respecto de la normal. Este es un caso único de inducción de una enzima mitocondrial en animales. También la actividad de la AAL-dehidrasa en el hígado de individuos porfirianos, es el doble de la normal.

No entramos aquí a discutir las diversas clases de porfiria pero conviene precisar que nos estamos refiriendo concretamente a la porfiria aguda intermitente, no a la congénita, y a la porfiria inducida con drogas en animales de laboratorio. El síndrome porfiriano no en todos los casos incluye alteraciones de la conducta o de la actividad mental, pero tales alteraciones se dan con frecuencia y son semejantes a las esquizofrénicas. En los casos de intoxicación crónica con Pb. también está elevada la tasa de porfirinas excretadas, pero no tenemos suficientes datos para asegurar que se trata del mismo mecanismo etiológico.

2). En 1960, Gajdos y col. publicaron los primeros resultados del tratamiento de la porfiria con AMP y el Dr. D. Nieto, desde 1963 trató 43 casos de enfermedad mental con dosis de 100-200 mg./día de AMP, obteniendo la desaparición del cuadro psicótico. De los 43 casos, 32 eran de esquizofrenia y 25 de ellos mejoraron notoriamente; los 7 restantes comprendían casos de mayor duración que no respondieron a éste tratamiento.

El AMP no tiene por sí mismo acciones farmacológicas, no es ni sedante ni estimulante; ~~debemos pensar pues, que actúa como regulador metabólico.~~ Gajdos(7), con ésta hipótesis en mente, logró demostrar que el AMP alivia la porfiria inhibiendo la sin-

tesis de porfirinas. Para localizar el sitio del efecto inhibitor, incubaba durante  $\frac{1}{2}$  horas a  $38^{\circ}\text{C}$ . y pH de 7.4 muestras de 10 ml. de sangre de conejo, con tres substratos diferentes: 50 mg. de glicina; 2 mg. de AAL y 2 mg. de PBG. Otras mezclas iguales, contenían además una dosis de AMP  $M/200$ . Encontraba que el AMP inhibe la síntesis de porfirinas cuando el substrato es glicina o AAL, pero no cuando es PBG, de lo cual se deduce que la inhibición ocurre a nivel del AAL. En la porfiria el AMP debe intervenir modificando la cinética de la transformación AAL - porfirinas.

En un experimento similar(8), Gajdos aclaró que se requiere el nucleótido completo para lograr el efecto terapéutico, ya que ni la adenina ni la adenosina inhibían la síntesis de porfirinas.

3.) El precursor inmediato del AAL - la glicina - también se encuentra implicado en los trastornos mentales. Se ha observado que la conjugación de la glicina con el ácido benzóico es anormal en los estados de catatonia, y también al administrar mecalina, durante el periodo de inducción de alucinaciones. Por otra parte, de acuerdo con datos aún en fase experimental, no publicados, Nieto y col. han encontrado alterada la respuesta a una sobrecarga de glicina, en los enfermos mentales, y han encontrado en ellos, la presencia de glicina en la orina en ayunas.

Completamos éste capítulo señalando la importancia del AAL, en otros posibles campos de la bioquímica. Se ha sugerido que

la anemia debida a carencia de vitamina B-6, podria explicarse por la intervencion de ésta coenzima en la formacion del AAL a partir de glicina y succinato, ya que el AAL se requiere para la sintesis del hem. Por otra parte, el AAL interviene tambien en la biosintesis de la vitamina B-12 y debe ser estudiado para comprender la bioquimica de esta importante y compleja vitamina ;del C-delta del AAL provienen un metilo y los metilenos que forman puente entre los anillos pirrólicos. Esta participacion del AAL en la sintesis de la vitamina B-12 fue demostrada con AAL-C<sub>14</sub> en cultivos de "Actinomices" (2) .

- III -

FARMACOLOGIA DEL AAL .

El AAL no altera en forma alguna la presion sanguinea o la actividad del corazon (13) ; tampoco modifica la respuesta de los tejidos a la accion de la histamina, la acetil-colina o la 5-hidroxi triptamina. Si se administra oralmente, es excretado rapidamente por el riñon. El unico efecto farmacológico que conocemos es el encontrado por Scott (27 , p.43) en el curso de un autoexperimento : la ingestion de AAL provoca una transitoria hipersensibilidad a la luz.

Administrando AAL por via subcutanea a ratas blancas, y exponiéndolas onseguida a la luz U-V se provoca ~~hiperemia e irritacion~~ de la piel. El AAL sólo, es decir, sin la posterior exposicion a la luz UV no tiene tal efecto. Por su parte, las

porfirinas tambien tienen efectos similares. Magnus, estableció en un caso de porfiria cutanea, sin otros síntomas, que habia hipersensibilidad a la luz de 400 milimicras, misma longitud de onda a la cual las porfirinas presentan absorción. Las porfirinas son estables ante fuertes agentes químicos, pero inestables ante la luz y la radiación gamma. Todo ésto tal vez pueda relacionarse con la hipersensibilidad a la luz que presentan los casos de porfiria con síntomas cutaneos.

#### - IV -

#### MÉTODOS PARA VALORAR EL AAL

Los métodos ideados para valorar el AAL, determinan en general amino-cetonas, de las cuales solamente el AAL y la aminoacetona son fisiológicas. (La aminoacetona proviene de la unión de glicina con acetato activo, con descarboxilación).

Pueden clasificarse éstos métodos analíticos en dos clases :

a).-Los que se basan en la reacción de Jaffé, que consiste en la formación de un compuesto anaranjado o café, de constitución desconocida, con picrato alcalino. La reacción de Jaffé es el fundamento tambien del método para valorar creatina y creatinina (Snell y Snell) y para ácidos hidantoín-3 acéticos.

b).-Los métodos basados en una previa condensación de Knorr, para transformar el AAL en un pirrol substituido que luego desarrolla color con reactivo de Ehrlich. El color que dan los pirroles con éste reactivo se aplica a la determinación de PBG, glucosamina y condrosamina (Elson y Morgan; "Biochem. J." 27:1824-1933).

Los dos tipos de métodos son colorimétricos y de orden micro-analítico, como corresponde al hecho de que las cantidades encontradas en orina y en sangre son del orden de microgramos.

Del segundo tipo es el método más antiguo, el de Mauzerall y Granick(1956) (17). La condensación de Knorr puede efectuarse con acetyl-acetona o con aceto-acetato de etilo, y se lleva a cabo en baño de agua caliente, regulando el pH a 4.6 en el primer caso y a 6.8 en el segundo. El reactivo de Ehrlich modificado con el cual se desarrolla el color, lleva 1 g. de p-dimetil-amino benzaldehído y 8 ml. de  $\text{HClO}_4$  al 70%, en un volumen total de 50 ml. con ac. acético glacial. La absorbancia se lee a 553 milimicras. La acetyl-acetona da en éste método mejores resultados, porque es menos sensible a interferencias de aminoácidos y glucosamina. La urea interfiere también porque da color amarillo con el reactivo de Ehrlich, de modo que es conveniente eliminarla mediante una columna Dowex-50; en esta resina la urea no es retenida y el AAL se eluye con acetato de sodio. El aceto-acetato tiene la ventaja de ser estable por más tiempo. El reactivo de Ehrlich es inestable, de modo que hay necesidad de prepararlo al usarlo. El límite de detección con éste método es de 0.5 microgramos de AAL y el error del método es de 5%. Los valores normales de AAL en orina de 24 horas, encontrados por Mauzerall y Granick, dan un promedio de 2.5 mg.

Del tipo "a" el método más antiguo es el descrito por Shuster(1956) (24). Consiste en modificar la reacción de Jaffé en el sentido de adicionar HCl al complejo formado con picrato alcalino. Para 1 ml. de muestra se ponen en éste método 0.1 ml.

solución saturada de ac. pícrico; 0.2 ml. de NaOH 10 N y 1 ml. de HCl 5N ; se lee a 450 milimicras.

La adición de HCl concentrado tiene por objeto, eliminar el color que da la creatinina, y a la vez intensifica el color debido al AAL. La acetona puede interferir porque da un color que también se incrementa con el HCl, de modo que en presencia de más de 100 microgramos de acetona, no es útil el método. Los derivados del ácido hidantoín-3 acético también dan un color naranja-rojizo en estas condiciones. Cuando se desea valorar ácidos de éste tipo, se acidula con  $\text{CH}_3\text{-COOH}$  en lugar de HCl, y se lee la absorbancia a 5,000 K. (Selah M y A. Berger-"J. Am. Chem. soc." 77:1893 , 1955).

El método de Elliot(1960) (5), también del tipo "a" utiliza para 0.25 ml. de muestra, un volumen igual de sol. sat. de ac. pícrico, agregando éste a 0°C. Manteniendo ésta temperatura, añade 0.5 ml. de NaOH 0.5 N y después de 15 minutos agrega 1.75 ml. de HCl 4 N. Se deja alcanzar la temperatura ambiente y diez minutos después se lee a 495 milimicras. Elliot prefiere ésta longitud de onda porque evita los errores debidos a la absorción del ac. pícrico entre 450-470 milimicras. Afirma también que el máximo desarrollo del color se obtiene si el tiempo entre la adición de NaOH y la adición de HCl es de 45" .

En 1963 fué publicado el método de Shawkia Kehani (21) que consiste en combinar la separación del PBG descrita por Kauerall y Granick, con el método de Shuster. La separación del PBG es indispensable, debido a que desarrolla color con el pi-

Además, dada la relación bioquímica entre los dos metabolitos es muy importante conocer las cantidades separadas de ambos.

Para absorber el PBG, Ūrata y Granick (25) emplean resina Dowex - 1. Mehani y nosotros hemos preferido la resina Dowex-2 que retiene el PBG, mientras que el AAL eluye libremente.

Por último, mencionaremos un método bioquímicamente muy exacto, que es el método enzimático. Consiste en incubar la muestra en presencia de AAL- dehidrasa y luego valorar el PBG formado. Los detalles de un método de éste tipo no se han estudiado, pero con base en la precisión de los métodos para valorar el PBG ( con reactivo de Ehrlich) es de suponer que con éste procedimiento se pueden detectar hasta 0.01 micromoles de AAL.

El método que empleamos inicialmente, se basó en lo descrito por Shawkia Mehani, pues buscábamos un método sencillo y más rápido que el de Mauzerall o el enzimático con todos los problemas que acarrea. Nos pareció que éste método era además, el que menos interferencias presenta, pues separando el PBG, no queda ninguna otra sustancia cuya constante presencia implique interferencia.

- V -

PRUEBAS PRELIMINARES

**1.) IDENTIFICACION DEL A.A.L.**

El AAL necesario para preparar una curva standard, fué adquirido a "Calbiochem" (California). Se determinó el punto de fusión del clorhidrato de AAL que recibimos y resultó de 143°C. A fin de asegurarnos de su identidad y pureza, se realizó una cromatografía en el solvente indicado por Elliot(5) :

etanol :  $\text{CH}_3\text{-COOH}$  1 N : piridina : agua

volumenes: 95 : 10 : 3 : 3

El papel se reveló rociando ninhidrina en solución alcoholica y se obtuvo una mancha azul, única. El Rf reportado por Elliot es de 0.15, valor que coincidió bastante con el nuestro: 0.17 ya que las diferencias en valores de Rf son siempre bastante tolerables Por la imposibilidad de reproducir exactamente las condiciones.

Un método cromatográfico alternativo consiste en formar un derivado pirrólico p.e. el 4-2' carboxietil,3 etoxicarbonil, 2-metil pirrol, el cual se extrae con eter y se corre en cromatografía ascendente sobre papel Whatman-1 en la sgte. mezcla:  $\text{NH}_3$  ( d : d.88) - agua - butanol ( 2:98:100 volúmenes). La mancha se revela con reactivo de Ehrlich.

**2. ) Reactivos empleados :**

Resina : Se empleó para la separación del PBG, resina Dowex-2 de 200-400 Mesh (Dow Chemical Co.), la cual se preparó para su empleo en la forma siguiente: Se lava por decantación con agua destilada hasta que el sobrenadante sea claro. Luego se pasa

de la forma Cloruro a la forma acetato, lavando con sol. de  $\text{CH}_3\text{-COONa}$  3M hasta que el filtrado esté libre de  $\text{Cl}^-$ . Después se lava con agua hasta la neutralidad. Se conserva en un recipiente, cubierta de agua, a temperatura ambiente.

ACIDO PICRICO : Se preparó una solución saturada a temp. ambiente, de ác. pícrico ( Baker & Adamson). (10 g/litro).

ACETATO DE SODIO 3 M : Se pesaron 246 g. de  $\text{CH}_3\text{-COONa}$  (M & B, Baker Co.) y se disolvieron lentamente en agua, aforando a 1 lt.

ACIDO CLORHIDRICO 5 N : Se preparó a partir del concentrado. HIDROXIDO DE SODIO 10 N : Se utilizó NaOH (M & B) gránulas.

ACIDO d-AMINO LEVULINICO : Suministrado por "Calbiochem", se prepararon dos soluciones de trabajo :

Sol. A : 10 mcg/ml. de AAL (1 mg/100 ml. de orina libre de PEG) .

Sol. B : 100 mcg/ml. de AAL ( 10 mg/100 ml. de orina)

APARATOS - A) Columnas de intercambio iónico

Se prepararon columnas de vidrio de 10 x 1 cm. provistas de un tapón horadado con un delgado tubo de vidrio. Se colocaba una capa delgada de algodón y otra de arena de Ottawa. Luego se empaca la resina por sedimentación, hasta una altura de 3 cm. Por encima de la resina y para protegerla de la desecación y de que se agite al poner la muestra, se puso

otra capítq de arena blanca. Preparadas las columnas en estas condiciones, gotean a un ritmo de 6 gotas por minuto, que es adecuado.

Doce de estas columnas se montaron en un soporte adecuado. Las columnas deben renovarse con cierta frecuencia ya que el paso de la orina las va oscureciendo y puede modificar su pH.

#### B) - Espectrofotómetro

Se empleó un espectrofotómetro "Beckman B" del laboratorio de Físico-Química y Análisis Instrumental. Para determinar el espectro de absorción se empleo un espectrofotómetro "Perkin-Elmer" de la división de Estudios Superiores de la Facultad.

#### PRUEBA DEL METODO DE KEHANI

Inicialmente se ensayó el método descrito por Kehani(21), que es el sgte : Se pasa 1 ml. exacto de muestra a traves de la columna, recibiendo en un tubo graduado, perfectamente limpio. Se lava la columna con dos porciones de 2 ml. de agua destilada, recibiendo en el mismo tubo anterior. Al filtrado, que contiene el AAL, se agregan 0.1 ml. de sol. sat. de ac. pícrico y 0.2 ml. de NaOH 10 N. Se agita y se añade 1 ml. de HCl 5N. Después de 10-15 minutos se transfiere el contenido a una cuba y se lee a 450 milimicras, usando como referencia 1 ml. de agua destilada tratada con los mismos reactivos.

Desde las primeras pruebas, se observó que al agregar el ácido, el color desarrollado se perdía totalmente y no se obtenía lectura. Para encontrar un posible error, se va-

loraron las soluciones y se ajustaron exactamente a las normalidades indicadas. Además, como no se obtenían volúmenes iguales de cada columna, se aforó a un volumen fijo, inicialmente de 6 ml. Se verificó el pH en cada uno de los pasos, observándose que el pH final era ácido, lo cual podía ser la causa de que el complejo micro-alcalino se disociara.

Después de muy diversas tentativas, se decidió no apearse al método, cuya descripción además, no era detallada, y establecer experimentalmente las condiciones adecuadas, mediante un estudio sistemático de ellas.

- VI -

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES ADECUADAS PARA LA VALORACION .

1.- Cantidad óptima de HCl

Se realizaron las pruebas descritas en la tabla 1, modificando únicamente la cantidad de HCl que se agrega. Se agregaba el ácido siempre, exactamente 45 " después de agregar el álcali. En estas pruebas se empleó un fotocolorímetro "Leitz" y se leía a 490 milimicras para tener diferencias más sensibles.

TABLA # 1

Tubo #	Concentracion	HCl (ml)	D.O. a 490 mmc. (Blanco: agua)
1	50 mcg/ml	0.2	0.70
2	"	0.3	0.79
3	"	0.4	0.81
4	"	0.5	0.40, decoloración
5	"	0.6	0.10, "
6	"	0.7	0.00

La cantidad adecuada para desarrollar un color duradero, es, pues, 0,4 ml. en lugar de 1 ml. de HCl 5N.

## 2. Longitud de onda más adecuada

Tomando en consideración las observaciones de Elliot, sobre el hecho de que el ac. pícrico puede absorber a la longitud de 450 milimicras, se decidió hacer un espectro de absorción. El espectro se hizo con una concentración de 10 mcg/ml y el volumen final a que se llevó la muestra fué de 10 ml. como en el método definitivo.

Como se observa en el espectro anexo, la máxima absorción del AAL corresponde a 490 milimicras, sin embargo, hemos preferido continuar empleando la longitud de onda original : 450 milimicras, porque permite trabajar en una zona más sensible de la escala del aparato. Aunque es evidente que el ac. pícrico absorbe más a 450 que a 490 milimicras, ésto no lleva a errores si se tiene el cuidado de poner siempre la misma cantidad exacta del reactivo, y se utilizó para todas las determinaciones la misma solución de ac. pícrico, conservada al abrigo de la luz y de los cambios de temperatura. Es recomendable el uso de ac. pícrico 0,2 M en lugar de sol.sat. para tener más precisa la concentración o bien extraer el exceso de ac. pícrico con eter, si bien esto no es muy práctico.



### 3 - Intervalos de tiempo adecuados para la determinación

Como se observó que según la cantidad de ácido que se pusiera, era diferente el tiempo que tarda en desarrollarse el color y que éste decae con el tiempo, se realizaron diversas pruebas variando el tiempo entre la adición de base y de ácido y entre la adición de ácido y la lectura.

Las tablas 2 y 3 reúnen los datos respecto de estos tiempos. Se observará que si no se toma con cuidado éste factor, la reproducibilidad del método será mala.

TABLA # 2  
Tiempo entre la adición de NaOH y  
la adición de HCl

t (segs.)	Lectura 5' después	En todos los datos, la concentración era de
45	0.05	10 mcg/ml y la D.Ø. de
60	0.06	450 milimicras
120	0.085	
5 min.	0.10	
6 "	0.10	

TABLA # 3  
Tiempo entre la adición de ácido  
y la lectura

t (min.)	Lectura a 450 mmicras.	La concentración es
1	0.06	de 10 mcg/ml y el tiempo entre la adición de
3	0.08	NaOH y de HCl, se mantuvo en 5 minutos.
5	0.10	
6	0.10	
7	0.10	
8	0.095	
10	0.09	
15	0.07	

En conclusión se fijaron como tiempos adecuados: ~~5 minutos~~ en el primer intervalo, 5 minutos en el segundo, lo cual implica que el tiempo total que se tarda una determinación es sólo de unos 12-15 minutos.

METODO DEFINITIVO - CURVA DE CALIBRACION

La curva de calibración se hizo con el método definitivamente adoptado, que detallamos a continuación :

1. Se mide un vol. exacto de sol. de AAL en orina normal, libre de PBG y de acetona. Se diluye a 5 ml. con agua destilada, para tener así un volumen equivalente al que se eluye de la columna cuando se usan orinas problema.

2. Se agregan 0.1 ml. de sol. sat. de ac. pícrico, se agita. 3. Enseguida se agregan 0.2 ml. de NaOH 10 N. Agitar.

4. Cinco minutos después, se añaden 0.4 ml. de HCl 5 N. Se agita perfectamente y se completa el volumen a 10 ml.

5. Cinco minutos después de haber agregado el ácido, se transfiere a una cubeta seca y se lee la absorbancia a 450 milimicras, ajustando el cero con un blanco hecho con agua destilada y los reactivos.

La curva que se obtiene con los datos reunidos en la tabla # 4, muestra un alejamiento de la ley de Beer, a concentraciones superiores a 0.4 micromoles, y a concentraciones muy bajas ( inferiores a 1 microgramo ). En el rango de concentraciones intermedias es bastante aceptable.

TABLA # 4  
CURVA DE CALIBRACION

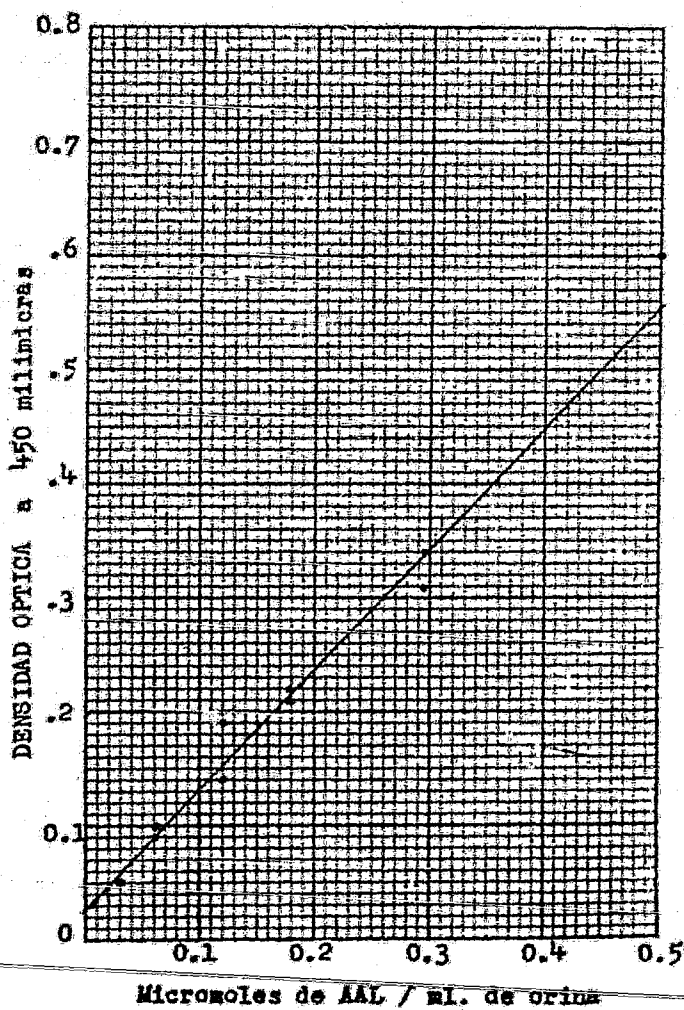
Tubo #	Sol. patrón A o B	Concentración en:		D. O. a 450 mm.
		mcg. de AAL-HCl	micromoles AAL-Base	
1	0.1 A	1	0.0059	0.03
2	0.1 A	1	"	0.04
3	0.5 A	5	0.0296	0.05
4	0.5 A	"	"	0.06
5	0.5 A	"	"	0.05
6	1.0 A	10	0.0593	0.10
7	1.0 A	"	"	0.10
8	0.1 B	"	"	0.11
9	0.2 B	20	0.1186	0.19
10	0.2 B	"	"	0.14
11	0.3 B	30	0.1780	0.21
12	0.3 B	"	"	0.22
13	0.5 B	50	0.2960	0.31
14	0.5 B	"	"	0.34
15	1.0 B	100	0.5930	0.53

- VIII -

COMPROBACION DEL METODO

Algunos factores que podrían afectar los resultados, fueron verificados enseguida. En primer término, interesaba verificar el funcionamiento de las columnas de intercambio iónico. Para demostrar que el PBG estaba siendo efectivamente

CURVA DE CALIBRACION



retenido en las columnas, se tomaron dos muestras iguales de orina normal; una de ellas se leyó directamente y la otra previa filtración por una columna. La diferencia entre las lecturas era suficientemente significativa:

Muestra	D.O. a 450 milimicras
1 ml. orina, directo	0.10
1 ml. orina, filtrada	0.06

Para comparar el funcionamiento de las columnas, se hicieron triplicados que se filtraban por columnas diferentes, con los resultados siguientes:

TABLA # 5

Comparación de las columnas de resina

Columna #	Concentración	D. O. a 450 milimicras
1	1 mcg/ml	0.025
2	1 "	0.030
9	1 "	0.030
3	10 "	0.11
5	10 "	0.10
7	10 "	0.12

Posteriormente se hicieron pruebas de recuperación, en la forma siguiente: Se determinó varias veces la concentración en una orina normal. Una vez conocida esta concentración, se le añadía una carga conocida de AAL y se volvía a determinar. El incremento en la lectura se comparaba con el teóricamente esperado. Los resultados se han reunido en la tabla # 6

TABLA # 6

## PRUEBAS DE RECUPERACION

Muestra	Sobrecarga	Micromoles encontrados	Micromoles calculados	% de recuperación	
Orina normal	0	0.08	-	-	
"	50 mcg.	0.38	0.376	101.06	Horas
"	20 "	0.18	0.200	90.00	
"	10 "	0.13	0.140	92.85	
"	1 "	0.080	0.086	93.02	

## IX

## VALORES NORMALES DE EXCRECION DE AAL EN ORINA

La determinación de los valores normales de excreción de AAL ya había sido realizada por algunos investigadores, pero nos interesaba precisar esos valores con un número de datos mayor que el que utilizaban y confrontar los resultados obtenidos. Es posible también que los datos citados en la literatura no correspondieran con exactitud a una muestra de 24 horas en la forma que nosotros la definimos, que consiste en no incluir la primera orina de la mañana, pero sí la del día siguiente en ayunas. De la mezcla de todas las eliminaciones de las 24 horas intermedias, se pedía al donador una cierta cantidad - unos 20 ml - para el análisis. Lo primero que se hacía al recibir estas muestras era verificar el pH, ya que en una ocasión se encontró una orina demasiado alcalina, lo cual afectó la prueba (en otra muestra de la persona en cuestión, se ajustó el pH a los límites normales y entonces pudo efectuarse la valoración). Se probaba la presencia de acetona, pues como hemos dicho un exceso puede interferir,

Los resultados que aparecen en la tabla # 7 son el promedio obtenido con triplicados de cada una de las muestras. Se indica el vol. total de orina en las 24 horas, a fin de poder expresar los resultados en micromoles por 24 horas .

Además de los valores normales de excreción se establecieron las curvas cicardianas o curvas de variación de la excreción durante el día. El objeto de conocer estas variaciones es por una parte, el tratar de facilitar la prueba, haciéndola p.e. simplemente sobre la orina en ayunas, lo cual evita inconvenientes al donador, pero por otra parte se trataba de buscar una significación bioquímica a estas variaciones. Más adelante se señala el posible significado de tales variaciones.

Se comparó también estadísticamente el valor de la excreción en hombres y en mujeres, para tratar de averiguar si las diferencias observadas podían tener alguna significación o no necesitan tomarse en cuenta.

Para efectuar las curvas cicardianas, se solicitaban muestras de orina excretada a determinadas horas, anotándose la hora precisa a la cual eran tomadas. Si se hace un promedio de los valores así obtenidos - con 3 a 5 muestras - se obtiene un resultado muy similar al obtenido con orina mezclada de 24 horas, lo cual significa que si es más fácil para el paciente, puede utilizarse el procedimiento de promediar los valores obtenidos en algunas eliminaciones.

TABLA # 7

## VALORES NORMALES DE EXCRECIÓN

Donador	Sexo	D.O. a 450 mmic.	Micromoles equivalentes	Vol. 24 hs.	Micromoles en 24 hs.
R.M.G.A.	F	0.06	0.03	800 ml.	24
S.L.G.	M	0.09	0.06	450	24
J.L.D.	M	0.06	0.03	663	19.9
L.H.M.	M	0.06	0.03	509	15.3
V.D.R.	F	0.055	0.027	760	20.5
A.P.H.	M	0.080	0.05	400	20.0
M.A.S.	F	0.04	0.01	1000	10.0
A.P.A.	M	0.06	0.03	500	15.0
D. N.	M	0.04	0.01	1000	10.0
J.P.M.	M	0.055	0.027	1000	27.0
P.P.M.	M	0.06	0.03	480	14.4
L.R.M.	M	0.08	0.05	420	21.0
M.C.	M	0.07	0.04	400	16.0
A.D.	F	0.065	0.035	500	17.5
M.G.H.	F	0.07	0.04	500	20.0
R.D.	M	0.05	0.02	860	17.2
J.B.	F	0.06	0.03	1000	30.0

n = 17      Promedio : 18.93 micromoles  
(2.47 mg.)

Error standard : 0.04 micromoles (0.005 mg.)

Valor real : 18.93  $\pm$  0.04 micromoles

COMPARACION ESTADISTICA DE LOS DATOS SEGUN  
EL SEXO

Datos masculinos :

24.0  
19.9     n = 11  
15.3      $\bar{Y} = 19.58$   
20.0  
15.0  
10.0  
27.0      $S_y^2 = 33.58$   
30.0  
21.0  
16.0      $S_y = 5.794$   
17.2

215.4

Datos femeninos :

24.0  
20.5     n = 6  
10.0      $\bar{Y} = 17.74$   
14.4  
17.5  
20.0  
 $S_y^2 = 24.46$   

---

106.4  
 $S_y = 4.946$

$$F = \frac{5.794}{4.946} = 1.17$$

para 10 y 5 g.l. y P del 5%,  $F = 4.74$ , por lo tanto las varianzas son homogéneas.

$$t = 2.08$$

para 15 g.l. y P del 5% ;  $t = 2.13$

Como el valor de "t" experimentalmente obtenido es menor que el tabulado para una probabilidad del 5%, se concluye que las diferencias debidas al sexo no son estadísticamente significativas.

CURVAS DE VARIACION DE LA CANTIDAD EXCRETADA

DURANTE EL DIA .

Sujeto # 1-) V.D.R. Sexo : F ; Sujeto # 2-) M.G.H. Sexo: F

Dia	Hora	D.O.		Dia	Hora	D.O.	
1	12 m	0.08	Micromoles	1	10	0.035	Micromoles
1	18 hs.	0.06	en 24 horas	1	22	0.050	en 24 hs.
1	22 "	0.085	calculados	2	8	0.075	calculados
2	6	0.075	con el pro- medio:	2	15	0.045	don el pro- medio :
			27 micromoles				15 micromoles

Sujeto # 3 : L.H.M. Sexo: M ;

Día	Hora	D.O.	Micromoles
1	12 m	0.04	en 24 horas
1	18 h.	0.07	calculados
1	22 "	0.05	según el pro-
2	8 2	0.10	medio: 17.5

Sujeto # 4: M.C. Sexo: M

Día	Hora	D.O.	Micromoles
1	18	0.04	Micromoles
1	22	0.05	en 24 horas
1	3:30	0.085	calculados
2	7	0.070	según el
2	13	0.040	promedio: 18 mcmoi.

Sujeto # 5: J.L.D. Sexo: M ;

Día	Hora	D.O.	Micromoles
1	10	0.05	Micromoles
1	11:30	"	en 24 hrs:
1	15	0.08	21.0
1	23	0.055	
2	3:30	0.095	
2	8	0.07	

Sujeto # 6: R.D. Sexo: M

Día	Hora	D.O.	Micromo-
1	7:45	0.07	les en
1	17	0.065	24 hs:
1	22	0.050	20
1	24	0.050	

- X -

#### EXPERIENCIAS TENTATIVAS CON INDIVIDUOS SUJETOS A LA ACCION DE DROGAS

Aunque no ha sido posible abarcar en esta tesis, el estudio de casos patológicos, he querido incluir dos casos de individuos que habían tomado algún fármaco. Aunque se trata sólo de dos casos, dan resultados muy significativos que nos hacen pensar que nuestras especulaciones están fundadas; su validez se discutirá más adelante.

Primer caso : El sujeto estaba siendo tratado para aliviar su depresión nerviosa e insomnio con los sgtes. fármacos : HALDOL y DIAZEPAM. Las dosis se indican en el cuadro, así como las horas a las cuales era ingerido el medicamento. El primero de estos fármacos es un neuroléptico mayor, muy potente; el otro es un sedante.

## Caso # 1 - E.D.

Día	Hora	D.O.	Micromoles en 24 horas: 36.9
1	9	0.15	
1	10	Tomó Haldol 1 mg.	
1	19	0.16	
1	22:30	Tomó "Pacitram" (Diazepam): 5 mg.	
1	23	0.14	
2	7	0.07	

Segundo caso : Se trata de un individuo cuyos valores normales ya habían sido determinados. Resulta pues muy interesante ver la alteración provocada por la ingestión de un comprimido de "Dextroanfetamina".

## Caso # 2 - A.P.A.

Día	Hora	D.O.	Micromoles en 24 horas : 25
1	10	0.05	
1	22	0.08	
1	22:05	Tomó una cápsula de "Dextroanfetamina"	
2	7	0.12	

Comparando con el dato que aparece en la tabla # 7, se observa un aumento de 10 micromoles, aunque el promedio sigue estando dentro de los límites normales.

METODO EN SANGRE

El método del complejo picro-alcalino, ya había sido aplicado por Shuster a la sangre (24), pero no han sido determinados los valores normales en sangre humana. Shuster desproteiniza la sangre con  $\text{CCl}_3\text{-COOH}$  al 10% y Laver y col. (16) con el mismo ácido al 5%. Laver lee el color desarrollado a 420 milimicras y las cantidades de reactivos que utiliza son las siguientes: 0.2 ml. de sol. sat. de ac. pícrico ; 0.5 ml. de NaOH 2.5 N y 1 ml. de HCl 8N; el exceso de ac. pícrico lo extrae con dos porciones de 10 ml. de eter y una de 10 ml. de petroleo ligero.

Nos interesaba determinar el AAL en sangre, para saber los niveles en sangre y para asegurarnos de que las variaciones observadas en la excreción no eran simplemente debidas a la concentración de la orina. El método aplicado fué el siguiente ; Se extrae la sangre de una vena, sin estásis y usando oxalato de sodio como anticoagulante. Se mide 1 ml. exacto y se hemoliza con 4 ml. de agua. Se agregan 2 ml. de ácido tricloroacético al 10%, lentamente y con agitación. Se filtra, se lava el precipitado con agua destilada y en el filtrado se neutraliza la acidez con NaOH hasta tener un pH entre 5 y 7 . Se pasa por la columna de resina Dowex-2 para eliminar el PBG y se procede como en el caso de la orina.

Así aplicado el método nos dió resultados poco precisos, ya que las cantidades encontradas se encuentran en el límite de detección de nuestro método. La cantidad presente en

sangre es según nuestros datos, de aprox. 1 mg(7 micromoles) por 100 ml. y no hay variaciones detectables durante el día. No hemos incluido los datos porque no estamos satisfechos del método y pensamos que dará mejores resultados, con algunas modificaciones.

## - XII -

### METODO EN HOMOGENADOS DE TEJIDOS

Con el objeto de poder llevar a cabo algunos de los experimentos que se proponen para realizarlos proxicamente, hemos estado experimentando un método en tejidos. A fin de que la presente exposición quede más completa, incluyo aquí la descripción del método de Urata y Granick(25) para valorar AAL en mitocondrias de hígado, que es el que he ensayado.

El tejido se homogeniza en un homogenizador de Potter-El vehjem. Se toman dos ml. de homogenado y se desproteinizan con 2 ml. de  $\text{CCl}_3\text{-COOH}$  0.3 M. Diez minutos después, se centrifuga. Se toman 2 ml. de sobrenadante y se neutralizan con 0.3 ml. de  $\text{NaOH}$  1 M y 0.5 ml. de  $\text{CH}_3\text{-COONa}$  0.5M, hasta tener un pH entre 5 y 6. Se absorbe el PBG en una columna de resina Dowex de 1 x 3 cm. y se lava la columna con 6 ml. de agua. También se pasa por una columna de "Amberlite -IRC 50" a pH 5, de 1 x 7 cm. para absorber la aminoacetona, lavando con 10 ml. de agua. El AAL en un volumen aprox. de 20 ml. se determina en la forma usual.

CONCLUSIONES - DISCUSION  
EXPERIMENTOS QUE SE SUGIEREN

a) Discusión de los aspectos analíticos

Los valores normales obtenidos con nuestro método estan en buen acuerdo con los citados por otros métodos. Asi p.e. Mauzerall y Granick dan como valor promedio: 2.5 mg. y Elliot obtiene el mismo valor, pero mientras que desconocemos la dispersión de sus datos, nosotros hemos considerado importante fijar éstos, para normar un criterio que permita distinguir un caso normal de uno patológico. Hemos encontrado valores "normales" desde 10 hasta 24 micromoles ; la desviación tipo sin embargo, es sólo de 0.17 micromoles. En casos de porfiria se encuentran 200-300 micromoles y aún más, de modo que la diferencia con los valores normales, aún dentro de su gran variabilidad, es indudable.

El método de valorar el AAL sirve pues como un método de diagnóstico de algunos trastornos, y en el caso de la porfiria, puede hacerse el diagnóstico más preciso midiendo la actividad de la sintetasa, para lo cual se requiere naturalmente, valorar el ácido que forma después de incubación.

Respecto a las condiciones del método, podemos afirmar que las variaciones normales de temperatura no afectan los resultados. El pH debe conservarse entre 5 y 7, pero dentro de ese rango sus oscilaciones no afectan. Es muy importante en

cambio, para obtener resultados reproducibles, mantener los tiempos entre la adición de álcali y de ácido y el tiempo al cual se efectúa la lectura, así como la dilución final que se haga. Una vez añadido el ácido, el color dease a una velocidad constante, pero nuestra experiencia indica que una diferencia de unos dos minutos en el tiempo de lectura, no afecta notoriamente los resultados. No sucede igual con el tiempo entre la adición de álcali y la de ácido, que debe controlarse con una tolerancia de diez segundos como máximo.

La interferencia debida a la aminoacetona aunque es real no tiene mayor influencia porque las cantidades de aminoacetona presentes en la orina normalmente son despreciables. A la interferencia de la creatinina podemos atribuir las diferencias que se observan cuando se añade más álcali o cuando no se hace con los tiempos señalados. La interferencia de cetoácidos o acetona, sólo se presenta en casos patológicos y entonces, invalida el método, siendo más fácil y conveniente aplicar el método del reactivo de Ehrlich.

#### b) Discusión de la parte experimental

Las variaciones observadas en la excreción durante el día pueden atribuirse a variaciones en la cantidad de orina, debidas a las comidas, bebidas, ejercicio, etc., sin embargo resulta notorio que la orina en ayunas, que es la de mayor volumen, sea casi siempre la más rica en AAL. La única manera de poder asegurar que ésto se debe a una modificación metabólica y no es un artificio consiste en determinar si-

multaneamente en orina y en sangre y relacionar las variaciones con las horas en que se ingieren alimentos, bebidas etc. Se requiere para ello, perfeccionar tambien el método en sangre, disminuyendo la dilución, para hacerlo más sensible.

En cuanto a los dos sujetos que habían ingerido fármacos sólo una apreciación cualitativa cabe por ahora. Hay un efecto neto de elevación de la tasa de excreción, en los 2 casos; el primero se sale de los límites normales, en todas las ocasiones en que se le determinó. Es difícil por el momento, relacionar los resultados con las observaciones clínicas que se han hecho con el AMP. En el caso de porfirias experimentales, el AMP disminuye la excreción de AAL. En el caso de esquizofrénicos, el AMP provoca una desaparición - o disminución - de los síntomas psicóticos; la acción del AMP ha de alterar el metabolismo del AAL pero no en una forma simple, ya que hay diversas hipótesis plausibles, así p.e. Brown (3) considera que la regulación de la cantidad excretada de AAL depende del ciclo de Krebs; Burnham y Lascelles, con base en sus observaciones en "Rhodopseudomonas spheroides" ("Biochem.J." 87:462, 1963) suponen que la regulación puede hacerse por un mecanismo de retroceso, que de manera simple sería el siguiente: el exceso de hem disminuiría la actividad de la AAL - sintetasa. Otra hipótesis fija el mecanismo

regulador a nivel de la transaminasa que - en presencia de ac. pirúvico como aceptor - transforma el AAL en semi-aldehído 2-oxi-glutárico, el cual directamente va a ceder un C para la formación de AMP.

Como algunas enzimas del ciclo del AAL estan en la fase acuosa de la célula, es de suponer que el AAL, después de sintetizarse en las mitocondrias hepáticas, atraviesa la doble membrana de éste organelo; fuera de la mitocondria pasa hasta coproporfirinógeno, el cual regresa al interior de la mitocondria y allí pasa a hem. Sano y Granick consideran por ello que alteraciones de la permeabilidad de la membrana mitocondrial pueden regular la síntesis de porfirinas y por consiguiente, el consumo de AAL .

Como puede apreciarse, nuestra tesis contribuye en muy poco al esclarecimiento de estas cuestiones. Las siguientes experiencias en pryecto, necesarias para ir esclareciéndolas, no pudieron ser incluidas en la tesis por razones de tiempo.

### c). Experimentos que se proyectan

El primer proyecto consiste en determinar la tasa de excreción de AAL en orina en un grupo testigo, constituido por individuos de ambos sexos, recluidos en hospitales, pero no enfermos mentales. Este grupo testigo se comparará con un grupo formado por enfermos mentales que no esten ya siendo tratados con medicamentos y otro grupo formado por enfermos tratados con determinadas drogas (p.e. AMP) o métodos. El escoger como testigo un grupo de hospitalizados ~~evitará~~ los posibles errores debidos a diferencias alimen-

ticias, ambientales, etc. Este grupo testigo debe ser lo más numeroso posible para que la diferencia -si la hay- sea más significativa.

Por otra parte, utilizando ratones mantenidos en jaulas metabólicas, podrán hacerse determinaciones en orina para establecer los valores normales de excreción y luego los valores de excreción de AAL en ratones sometidos a fármacos como la anfetamina, Clorpromazina, LSD, etc.

Correlacionar los niveles hemáticos con los urinarios y con los encontrados en homogenados de hígado o cerebro, es otra fuente de interesantes datos, que pueden obtenerse en animales de experimentación.

Es muy importante también, perfeccionar el método de valoración en sangre como se indicó anteriormente, para comprobar el significado de las variaciones en la excreción durante el día.

Queda en fin, como en todos los ámbitos de la ciencia, un inmenso campo abierto para quienes tienen la fortuna de poder dedicar todo su tiempo a la investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

( El número entre paréntesis es el citado en el texto)

- ( 1 ). Berlin N.I. ; A. Neuberger ; J.J.Scott  
 "The metabolism of d-ALA studied with the aid of  $^{15}\text{N}$  "  
 "Biochem. J." 64: 80-100 ; 1956
- ( 2 ). Bray R.C. ; D.Shemin - "On the biosynthesis of vitamin  
 B-12" - "J.Biol.Chem." 238 : 1501-07 ; 1963
- ( 3 ). Brown E.G. - "The relationship of the tricarboxylic acid  
 cycle to the synthesis of d-ALA in avian erythrocyte pre-  
 parations" - "Biochem. J." 70: 313 - 321 ; 1958
- ( 4 ). Castellanos G. ; B.Anguiano - "Aspectos bioquímicos de  
 la porfiria aguda(experimental)intermitente"  
 "Neurol.Neuroc.Psiq." 8: 145-168 ; 1967
- ( 5 ). Elliot W.H. - "The estimation of aminoacetone and d-AL A"  
 "Biochem.J." 74 : 91-94 ; 1960
- ( 6 ). Gajdos A.; M.Gajdos-Torök - "La localisation biochimique  
 de l'action inhibitrice de l'AMP sur la biosynthese des  
 porphyrines" - "C.R.Soc.Biol." 156 : 258-61 ; 1962
- ( 7 ). Gajdos A.; M.Gajdos-Torök - "Etude de l'action de l'ade-  
 nine, de l'adenosine et de l'AMP sur la porphyrie experi-  
 mentale" - "C.R.Soc.Biol." 156 : 222-26 ; 1962
- ( 8 ). Gajdos A.; M.Gajdos-Torök - "Les systemes enzymatiques de  
 la biosynthese de l'heme" - "SANG" 30: 445-48 ; 1959
- ( 9 ). Gajdos A. - "Données recents concernant la biosynthese des  
 porphyrines et les porphyrias" -"Presse medicale" 24:1229-32  
 - 1963
- ( 10 ) Granick S. - "Induction of the synthesis of d-ALA synthe-  
 sis in culture by chemicals

that induce acute porphyria"

"J.Biol.Chem." 238: PC 2247-49 ; 1963

- ( 12 ) Gibson K.D. ; A.Neuberger ; J./J.Scott - "The purification and properties of d-ALA dehidrase"  
"Biochem.J." 61: 616-628 ; 1955
- ( 12 ) Jarrett A. ; C. Rimington ; D.A. Willoughby  
"d-ALA and porphyria" - "Lancet" 1 : 125-127 ; 1956
- ( 13 ) Kikuchi G. ; A.Kumar ; Ph.Talmage ; D.Shemin  
"The enzymatic synthesis of d-ALA"  
"J.Biol.Chem." 233: 1214-19 ; 1958
- ( 14 ) Kovalski E. ; A.M.Dancewicz ; Z.Szot ; B.Lipinski ;  
O.Rosick - "Studies on d-ala transamination"  
"Acta Biochim.Polon." 6: 257 ; 1959
- ( 15 ) Laver W.G. ; A.Neuberger ; S.Udenfriend - "Initial stages on the biosynthesis of porphyrins"  
"Biochem.J." 70: 4-14 ; 1958
- ( 16 ) Mauzerall D. ; S.Granick - "The occurrence and determination of d-ALA and PBG " - "J.Biol.Chem" 219:435 ; 1956
- ( 17 ) Nakao K. ; O.Wada ; T. Kitamura ; K.Uono  
"Activity of ALA - synthetase in normal and porphyric human liver" - "NATURE" 210: 838-39 ; 1966
- ( 18 ) Narisawa K. ; G.Kikuchi - "Effect of inhibitors of DNA ~~SYNTHESIS~~ on induced increases of d-ALA synthetase and other enzymes in rat liver "  
"Biochem.Biophys.Acta" 99: 580-583 ; 1965

- (19 ). Nemeth A.M. ; C.S.Russell ; D.Shemin  
 "The succinata-glycine cycle" - "J.Biol.Chem" 229: 415-22  
 1957
- (20 ). Shawkia M. - "A rapid method for the determination of  
 d-ALA in urine" - "Brit.J.Indust.Med." 21: 78-80 ; 1963
- (21 ). Shemin D. ; C.S. Russell - "d-ALA ; its role in the bio-  
 synthesis of porphyrins and purines"  
 "J.Am.Chem.Soc." 75: 4873 ; 1953
- (22 ). Shemin D. ; C.S.Russell ; T.Abransky - "Succinate-glyci-  
 ne cycle " -"J.Biol.Chem." 215 : 613 ; 1955
- (23 ). Shuster L. - "The determination of d-ALA"  
 "Biochem.J." 64 : 101-106 ; 1956
- (24 ). Tschudy D.P. ; M.G.Perlroth ; H.S. Marver ; A.Collins et al.  
 "Acute intermitent porphyria"  
 "Proc.Nat.Acad.Sci." 53: 841 ; 1965
- (25 ). Urata G. ; S. Granick - "Biosynthesis of alfa-amino keto-  
 nes and the metabolism of aminoacetone"  
 "J.Biol.Chem." 238 : 811-820 ; 1963
- (26 ). Watson C.J. ; R. Pimenta de Mello et al.  
 "Porphyrin chromogens or precursors in urine,blood,bile  
 and feces" - "J.Lab.Clin.Med." 37 : 831-42 ; 1951
- (27 ). "Ciba foundation symposium on Porphyrin biosynthesis and  
 metabolism" - Eds : G.E.W.Wolstenholme y C.P.Claine Millan  
 J & A.Churchill Ltd. Londres,1955
- (28 ). Falk J.E. -"Porphyrins and metalloporphyrins" - Elsevier,1961
- (29 ). Woolley D.W. - "The biochemical basis of psychoses"  
 Wiley & sons , New-York , 1962