

**Artículo de revisión****Interpretación del tamiz metabólico. Análisis de aminoácidos (II de IV partes)**

*Dra. Marcela Vela,\* Enfra. Isabel Cicerón,\* QFB Martha Pérez,\* QFB Joel Ortiz,\* M en C Isabel Ibarra,\* M en C Zazil Olivares,\* T. Lab. Ricardo Morales,\* QC Claudia González,\* Biol. Salvador Gamboa,\* Dr. José Rivera\**

**Características bioquímicas de los aminoácidos**

Los aminoácidos son compuestos bioquímicos heterogéneos cuya característica común es la presencia de un grupo amino primario o secundario y un grupo ácido que, aunque generalmente es un carboxilo, puede ser un sulfhidrilo o un fosfato. Los aminoácidos son los componentes primarios de las proteínas, también actúan como intermediarios en ciclos metabólicos importantes y algunos pueden funcionar como neurotransmisores. Existen más de 200 aminoácidos diferentes en la naturaleza, pero sólo cerca de la décima parte de ellos están en las proteínas. Los aminoácidos suelen clasificarse en siete grupos, según las características de sus cadenas radicales (cuadro 1).

La sintomatología de los trastornos de los aminoácidos es muy diversa; sin embargo, la investigación de laboratorio de estas enfermedades tiene un patrón relativamente simple: Casi la mayoría de los trastornos de los aminoácidos puede diagnosticarse mediante técnicas cromatográficas en las que se analiza el contenido de éstos en los fluidos biológicos, especialmente en la sangre y la orina.

En este artículo se señalan las técnicas que se utilizan en el Instituto Nacional de Pediatría para el estudio de los aminoácidos, así como su interpretación.

**Tamiz metabólico para el estudio de los aminoácidos**

El tamiz metabólico rutinario para los trastornos de los aminoácidos incluye pruebas químicas urinarias cualitativas,

tales como la del cloruro férrico, la de la dinitrofenilhidracina, la del cianuro-nitroprusiato, y la de Benedict, entre otras.

Estas pruebas se describieron ampliamente en la primera parte de esta serie.

**1. Pruebas cualitativas**

a) Cromatografía de los aminoácidos en capa fina, en sangre y en orina

La cromatografía es un procedimiento mediante el cual se separan las mezclas de las moléculas. La enorme diversidad química de los aminoácidos facilita su separación.

La cromatografía de los aminoácidos puede realizarse en forma unidimensional y bidimensional; es mejor la segunda ya que permite una mejor separación de los aminoácidos. Este análisis permite conocer en forma llana si existe acumulación de uno o más aminoácidos. La ninhidrina es el reactivo que se utiliza como "revelador" y que deja visualizar los aminoácidos en forma selectiva y sensible.

Una cromatografía de aminoácidos "alterada" se distingue de una "normal" cuando alguna de las manchas que corresponden a un aminoácido es más intensa que las otras. De acuerdo con la posición " $R_f$ " [distancia recorrida por un soluto (aminoácido) dividida entre la misma recorrida por el sistema de corrimiento (frente)] se puede saber de qué aminoácido o aminoácidos se trata (figura 1).

La cromatografía cualitativa es todavía la forma más utilizada para la investigación de los trastornos del metabolismo y la más fácil de realizar en los laboratorios bioquímicos; sin embargo, la introducción de controles de calidad externos ha mostrado que en manos inexpertas los resultados (llamados "cromatogramas") son con frecuencia malinterpretados.<sup>2</sup>

Esta técnica es particularmente valiosa en pacientes cuyo cuadro clínico es sugestivo de una aminoacidopatía, como la fenilcetonuria, la enfermedad de jarabe de arce, la aciduria

\* Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto Nacional de Pediatría.

Correspondencia: Dra. Marcela Vela A. Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, 04530, México, DF.

Recibido: Julio, 2001. Aceptado: Noviembre, 2001.

arginosuccínica y la citrulinemia. Sin embargo, la separación de los aminoácidos más polares (serina, treonina, tirosina, ácido glutámico, ácido aspártico y la cisteína) es pobre y tiene poca validez en la búsqueda de trastornos de estos últimos, por lo que ya no se utiliza actualmente como prueba diagnóstica definitiva.<sup>3</sup>

b) Sobretinción para aminoácidos azufrados

Sobre una cromatografía en papel, uni o bidimensional, revelada con ninhidrina, se puede aplicar una tinción de azida de yodo que mostrará en forma específica los aminoácidos que contengan tioles y disulfuros (cisteína, cistina y homocistina). Esta sobretinción sirve de apoyo diagnóstico rápido para los trastornos en la cistina y la homocisteína, pero no es útil para la metionina.<sup>4</sup>

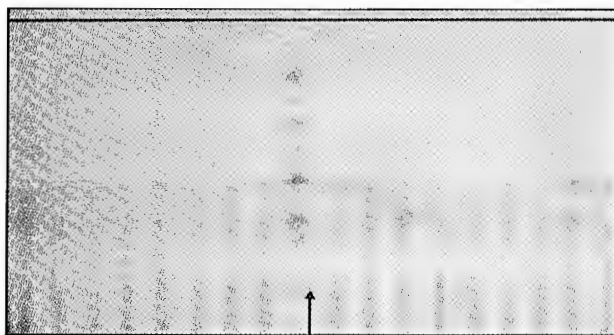
**Cuadro 1.** Clasificación de los aminoácidos según su cadena lateral

Grupo	Nombre común	Símbolo
I. Con cadenas laterales alifáticas	Glicina	Gli (G)
	Alanina	Ala (A)
	Valina	Val (V)
	Leucina	Leu (L)
	Isoleucina	Ile (I)
II. Con cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo	Serina	Ser (S)
	Treonina	Tre (T)
	Cisteína*	Cis (C)
III. Con cadenas laterales que contienen azufre	Metionina	Met (M)
	Acido aspártico	Asp (D)
IV. Con cadenas laterales que contienen grupos ácidos o sus amidas	Asparagina	Asn (N)
	Acido glutámico	Glu (E)
	Glutamina	Gln (Q)
	Arginina	Arg (R)
	Lisina	Lis (K)
V. Con cadenas laterales que contienen grupos básicos	Histidina**	His (H)
	Fenilalanina	Fen (F)
	Tirosina	Tir (Y)
VI. Con anillos aromáticos	Triptófano	Tri (W)
	Prolina	Pro (P)
	4-hidroxiprolina	
VII. Iminoácidos		

Modificado de Harper *et al.*<sup>1</sup>

\* El aminoácido cistina, consiste de dos residuos de cisteína ligados por una unión disulfuro.

\*\* La histidina también puede considerarse como parte del grupo VI puesto que contiene un grupo aromático imidazol.



**Figura 1.** Cromatograma unidimensional de los aminoácidos y estándar.

## 2. Pruebas cuantitativas

a) Fluorimetría para la fenilalanina

Es un método fácil, económico y confiable para conocer las concentraciones de fenilalanina en la sangre depositada en un papel filtro.

b) Cuantificación de aminoácidos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), es un método moderno de separación de moléculas que se utiliza para la cuantificación de los aminoácidos en la sangre, la orina, el líquido cefalorraquídeo o en el humor vítreo, entre otros fluidos biológicos. Con esta metodología se puede confir-

mar el diagnóstico de la mayoría de los trastornos de los aminoácidos.<sup>5</sup>

### Muestras ideales para el análisis de los aminoácidos y valores de referencia

Cuando se buscan trastornos de los aminoácidos es conveniente estudiar en forma simultánea la sangre y la orina del paciente puesto que, en algunas ocasiones, una elevación moderada de los aminoácidos sólo puede detectarse en la sangre. En otras ocasiones, la acumulación de aminoácidos con umbral renal muy bajo así como los defectos del transporte renal sólo se pueden apreciar en la orina. Los aminoácidos con reabsorción tubular alta, particularmente la fenilalanina, la tirosina, la metionina y los aminoácidos ramificados, son más fáciles de investigar mediante el análisis de sangre.

El líquido cefalorraquídeo (LCR) se usa frecuentemente como información adicional para confirmar diagnósticos; sin embargo, en algunas enfermedades como la hiperglicinemia no cetósica es indispensable conocer los valores de los aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo y obtener un cociente (LCR/plasma) que, en caso de resultar anormal, nos dará el diagnóstico de dicha enfermedad. El humor vítreo puede ser especialmente valioso para el diagnóstico postmortem de los trastornos metabólicos cuando la orina no esté disponible o la sangre no pueda estudiarse por los cambios de degradación. Las concentraciones de los aminoácidos en el humor vítreo son casi iguales a las del plasma, excepto las del ácido glutámico, la prolina, y la glicina, que están disminuidas a la décima parte en el humor vítreo.

El líquido amniótico tiene un valor limitado en el diagnóstico prenatal de las aminoacidopatías puesto que, a diferencia de los trastornos de los ácidos orgánicos, en la mayoría de las alteraciones de los aminoácidos, los metabolitos no se acumulan antes del nacimiento y, por lo tanto, las concentraciones de los aminoácidos suelen ser normales, excepto en la deficiencia de arginosuccinato liasa (acidemia arginosuccínica) y en la de argininosuccinato sintetasa (citrulinemia).

El cuadro 2 muestra los valores de referencia de los aminoácidos en la sangre, la orina y el líquido cefalorraquídeo que se utilizan en este instituto. Hay que hacer notar que estos valores pueden cambiar de laboratorio a laboratorio, según la técnica empleada, y que lo ideal es que cada centro establezca sus propios valores de referencia.<sup>6</sup>

**Cuadro 2.** Valores de referencia de los aminoácidos en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría

Aminoácido	Plasma	Orina	LCR*
Glutámico	10-133	0.02-0.66	0.8-10.6
Serina	317-1368	2.24-3.00	417-909.5
Glutamina			
Citrulina	3-35	ND-0.2	1.3-7.8
Glicina	81-436	2.25-20.72	3.8-7.9
Treonina	24-174	ND-2.47	15.1-130.2
Arginina	12-133	ND-0.18	11.9-31.7
Alanina	143-439	0.84-6.09	16.4-40.9
Tirosina	22-108	ND-1.17	
Valina	64-294	ND-0.40	11.9-29.4
Metionina	9-42	ND-0.28	1.5-7.4
Isoleucina	31-86	ND-0.25	4.6-11.7
Triptófano	23-71	NEDA	2.1-7.5
Leucina	47-155	0.068-0.503	12.4-19.6
Fenilalanina	31-75	ND-1.34	5.2-22.5
Ornitina	22-103	ND-0.48	2.8-19.2
Lisina	52-196	ND-4.42	11.6-36.5

\* Líquido cefalorraquídeo.

### Recolección de las muestras

Éste es un paso muy importante en la detección de los desórdenes metabólicos. En los pacientes gravemente enfermos, la sangre y la orina al momento del ingreso son las muestras más valiosas y apropiadas para realizar el tamiz metabólico. Es una buena práctica guardar las muestras de ingreso de todos los pacientes en quienes el diagnóstico no esté claro. En el cuadro 3 se anotan las cantidades y las condiciones que se requieren para el análisis de los aminoácidos en nuestro laboratorio.

**Cuadro 3.** Guía para la recolección de muestras para el análisis de los aminoácidos

Tipo de espécimen	Cantidad mínima en mL	Transporte	Almacenamiento
Sangre	3	En hielo	Centrifugar, remover el plasma o el suero y congelar a -20 °C
Plasma	1	Congelado	Congelar a -20°C
Suero	1	Congelado	Congelar a -20°C
Líquido cefalorraquídeo	1	Congelado	Congelar a -20°C
Orina	20	Congelado	Congelar a -20°C
Humor vítreo	0.5	Congelado	Congelar a -20°C

Modificado de Vela<sup>8</sup>

La sangre de los neonatos y de los lactantes que son alimentados a intervalos frecuentes debe recolectarse poco antes de la siguiente toma de alimento.

El manejo inapropiado de las muestras puede causar artefactos que repercutan en el contenido de los aminoácidos (cuadro 4). Por ejemplo, la sangre no centrifugada dejada a temperatura ambiente puede sufrir cambios; la cistina y la homocistina libres se pierden debido a que están unidas a las proteínas; la glutamina es inestable y se degrada cuando se almacena por tiempo prolongado. Las concentraciones bajas de serina en la orina se pueden deber a contaminación bacteriana, y la presencia de hidroxiprolina, a contaminación fecal. Los tubos con EDTA pueden producir artefactos positivos a ninhidrina que se visualizan como "manchas" anormales en los cromatogramas uni y bidimensionales.<sup>7</sup>

Para minimizar los artefactos, todos los especímenes (orina, suero, plasma y líquido cefalorraquídeo) deben almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ , si no se procesan el mismo día de su recolección. Si se van a transportar por mensajería hay que utilizar hielo seco para su empaque para conservar los metabolitos y evitar su degradación y la proliferación bacteriana.<sup>2,7</sup>

Cuando se recolectan las muestras de sangre deben mantenerse en refrigeración y centrifugarse lo más pronto posible para separar el suero o plasma. Para el análisis de los aminoácidos urinarios se prefiere una recolección de orina de 24 horas a una muestra aleatoria, aunque esto no siempre es práctico, especialmente en los bebés, por lo que en nuestro laboratorio se utiliza en forma rutinaria la orina postprandial.<sup>8</sup>

### Información y estado clínico del paciente

La información clínica completa es parte fundamental para el diagnóstico correcto de los errores innatos del metabolismo.

La química sanguínea, la gasometría, los electrolitos séricos, la brecha aniónica, la glucosa y el amonio proveen importantes pistas para saber la clase de trastorno metabólico de que se trata (ver parte I de la serie). Estos datos de laboratorio, junto con un breve resumen clínico, siempre deben llegar al laboratorio metabólico para una interpretación adecuada de las pruebas especializadas.<sup>2,8</sup>

### Interpretación y variación normal

Para la correcta interpretación de los resultados del tamiz metabólico de los aminoácidos es muy importante considerar que las concentraciones de los aminoácidos en los diversos fluidos corporales pueden verse influidas por muchos factores, tales como la edad, los cambios fisiológicos, el estado nutricional, la enfermedad, los medicamentos y las toxinas. Algunos medicamentos pueden causar artefactos que interfieren con el análisis o que pueden interrumpir el metabolismo normal de los aminoácidos y dar un patrón anormal, sugestivo de un error innato del metabolismo pero que, en realidad, sea una condición adquirida (cuadro 5).

El estado nutricional y la infección pueden también modificar el patrón cualitativo y deben tomarse en cuenta en la interpretación de las pruebas (cuadros 6 y 7).

El ritmo circadiano también influye en las concentraciones de los aminoácidos, ya que los aminoácidos sanguíneos se elevan en 10 a 15% en la tarde.

**Cuadro 4.** Elevaciones de los aminoácidos debidas a errores de recolección, transporte y almacenamiento de la muestra

Error/condición	Tipo de muestra	Aminoácidos afectados	Valor
Contaminación bacteriana	Orina	Ala, Gli, Pro.	Elevadas
Contaminación fecal	Orina	Trp, aminoácidos aromáticos, Ser.	Bajos
Contaminación con sangre	Orina	Ornitina	Elevada
Contaminación con leucocitos	Orina	Taurina	Elevada
Leucocitosis	Sangre	Asp, Glu, Taurina	Elevados
Hemólisis	Sangre	Asp, Glu, Gli, Ornitina	Elevados
		Arg, Gln.	Bajos
Almacenamiento	Orina	Glu, Asp, GABA	Elevados
		Gln, Asn.	Bajos
Almacenamiento	Sangre	Glutamina	Elevada
		Gln, Cis, Homocistina	Bajos
Muestra no centrifugada y dejada a temperatura ambiente	Sangre	Ornitina	Elevada
		Arg, Cis, Homocisteína	Bajos

Modificado de Shih V<sup>2</sup>

**Cuadro 5.** Efecto de la edad, cambios fisiológicos y toxinas en los valores de los aminoácidos

Factor/condición	Muestra	Aminoácidos alterados	Valor
Edad:			
Primera semana de vida	Orina	Taurina, Prolina Hidroxiprolina, Gli.	Elevadas
Primeros seis meses de vida	Orina	Pro, Hidroxiprolina, Glicina.	Elevadas
Prematurez	Orina	Cistationina.	Elevada
	Sangre	Tirosina.	Elevada
Ritmo circadiano	Sangre	Tir, Fen, Trp.	Elevados en la tarde
Ejercicio vigoroso y prolongado	Sangre	Val, Ile, Leu, Ala.	Disminuidos
Neonatos hipoglucémicos de madres diabéticas	Sangre	Ser, Tir, Met, Asp, Gli, Ala.	Disminuidos
Neonatos hipoglucémicos pequeños para la edad gestacional	Sangre	Ala, Gli, Pro, Val.	Elevados
Toxinas:			
Etilen glicol	Orina	Glicina.	Elevada
Plomo	Orina	Delta-aminolevulínico	Elevado
Segunda mitad del ciclo menstrual	Sangre	Ser, Thr, Glu, Pro, Lis, Ornitina.	Disminuidos
Embarazo	Orina	His, Arg, Thr.	Elevados

Modificado de Shih V<sup>2</sup>

**Cuadro 6.** Estado nutricional y valores de los aminoácidos

Factor/condición	Muestra	Aminoácido afectado	Valor
Dieta			
Fórmula o leche enlatada	Orina	Homocitrulina	Elevada
Gelatina	Orina	Glicina	Elevada
Proteínas altas (neonato-lactante)	Sangre	Met, Tirosina	Elevadas
Moluscos	Orina	Taurina	Elevada
Carne blanca y aves	Orina	Anserina, 1-metilhistidina	Elevadas
Kwashiorkor	Sangre	Pro, Ser, Gli, Fen	Elevadas
	Sangre	Leu, Ile, Val, Trp, Met, Thr, Arg	Disminuidas
Obesidad	Sangre	Aminoácidos ramificados, Fen, Tir	Elevados
	Sangre	Gli	Disminuida
Ayuno de 1 a 2 días	Sangre	Aminoácidos ramificados, Gli	Elevados
	Sangre	Ala	Disminuidos
Deficiencia de vitamina B6	Orina	Cistationina	Elevada
Deficiencia de vitamina B12	Sangre	Homocisteína	Elevada
Deficiencia de folatos	Sangre	Homocisteína	Elevada

Modificado de Shih V<sup>2</sup>

Un aumento generalizado moderado en los aminoácidos urinarios es un hecho relativamente frecuente en los niños hospitalizados. El vómito y el ayuno de uno a dos días de duración pueden causar elevaciones moderadas (de dos a tres veces) de los aminoácidos ramificados y esto no debe interpretarse como anormal. En el cuadro 8 se señalan los efectos de algunos medicamentos sobre los aminoácidos.

Los cambios de los aminoácidos pueden ser de naturaleza secundaria y ser la pista para identificar otros tipos de

enfermedades metabólicas, tales como la galactosemia, las acidemias orgánicas o los trastornos metabólicos del piruvato.

Se han observado grandes elevaciones de muchos aminoácidos, particularmente de glutamina y de alanina, en la sangre de niños moribundos. Los aminoácidos ramificados, la citrulina y la arginina son excepciones. Estos cambios probablemente son secundarios a la hipoxia y a la insuficiencia hepática. La sangre postmortem muestra un patrón similar, pero más pronunciado.

**Cuadro 7.** Efectos de distintas condiciones patológicas sobre los aminoácidos

<i>Condición</i>	<i>Muestra</i>	<i>Aminoácido afectado</i>	<i>Valor</i>
Quemadura $\geq 20\%$ de superficie corporal (0-7 días de la lesión)	Sangre	Fen	Elevada
Infección	Orina	Ala, Gli, Thr, Ser, Glu, Gln, Ornitina, Pro	Disminuidas
	Sangre	Todos los aminoácidos	Bajos
	Sangre	Cociente Fen/Tir	Elevado
Enfermedad hepática	Orina	Todos los aminoácidos	Elevados
	Sangre	Tir, Fen, Met, Ornitina, GABA	Elevados
	Sangre	Aminoácidos ramificados	Disminuidos
Hepatoblastoma	Orina	Cistationina	Elevada
Hipoparatiroidismo primario	Orina	Todos los aminoácidos	Elevados
Leucemia aguda	Orina	Enfermedad avanzada: todos los aminoácidos	Elevados
	Orina	Con quimioterapia, Gli, Asp, Thr, Ser	Elevados
	Orina	Cistationina	Elevada
Insuficiencia aguda	Orina	Fen, Valina	Disminuidas
	Orina	Histidina	Elevada
	Sangre	Fen, Citrulina, Cis, Gln, Homocisteína	Elevados
Dificultad-insuficiencia respiratoria con oxígeno	Sangre	Leu, Val, Ile, Glu, Ser	Disminuida
	Sangre	Cisteína	Disminuida
Raquitismo	Orina	Gli	Elevada

Tomado de Shih V<sup>2</sup>**Cuadro 8.** Efecto de los medicamentos sobre los valores de los aminoácidos

<i>Medicamento</i>	<i>Muestra</i>	<i>Aminoácido afectado</i>	<i>Valor</i>
Acetaminofén	Orina	El disulfuro acetaminofén-cisteína puede interferir con la fenilalanina	Elevada
Ampicilina o amoxicilina	Orina	Interfiere con la determinación de Met, Fen, arginosuccinato	Elevados
Infusión de arginina	Sangre	Arginina	Elevada
	Orina	Arg, Lis, Ornitina, Cistina	Elevada
Secuestradores de ácidos biliares (colestiramina, niacina)	Sangre	Homocisteína	Elevada
Carbamazepina	Sangre y orina	Glicina	Elevada
Cefalexina	Orina	Metabolito reactivo a ninhidrina	Mancha en el cromatograma
Methotrexate	Sangre	Homocisteína, cociente Fen/Tir	Elevados
Oxido nitroso (anestesia)	Sangre	Homocisteína	Elevada
Anticonceptivos orales	Sangre	Pro, Gli, Ala, Val, Leu, Tirosina	Disminuidos
Tamoxifén	Sangre	Homocisteína	Disminuida
Acido valproico	Sangre y orina	Glicina	Elevada
Vigabatrina	Orina	Interfiere con la determinación de fenilalanina	Elevada
Vinil-GABA	Orina	Alanina	

Tomado de Shih V<sup>2</sup>

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Harper HA, Rodwell, Mayes PA. Manual de Química Fisiológica. 7ª. Ed., México. Manual Moderno, 1980;pp 20-40.
2. Shih VE. Amino acid analysis. En: Blau N, Duran M, Blaskovics ME (Eds.) Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases. London. Chapman & Hall, 1996;pp 13-30.
3. Pollit RJ. Amino acid disorders. En: Holton JB (Ed.) The inherited metabolic diseases. 2nd. Ed., London. Churchill-Livingstone, 1994;pp 67-113.
4. Scriver CR, Clow CL, Lamm P. On the screening: Diagnosis and investigation of hereditary aminoacidopathies. Clin. Biochem 1973;6(3):142-88.
5. Hill D, Burnworth L, Skea W, Pfeifer R. Quantitative HPLC analysis of plasma amino acids as orthophthalaldehyde/ethanethiol derivatives. J Liquid Chromatog 1982;5:2369-93.
6. Perry TL, Hansen S. Technical pitfalls leading to errors in the quantification of plasma amino acids. Clin Chim Acta 1969;25:53-8.
7. Shih VE. Laboratory techniques for the detection of hereditary metabolic disorders. Cleveland, OH. CRC Press, 1973;pp 11-77.
8. Vela M, Jiménez-Sánchez G, Cicerón I, Velázquez A. Guía para el diagnóstico de los errores innatos del metabolismo. Programa de Actualización Continua (PAC), Parte D, Libro 4. México, DF. Academia Mexicana de Pediatría/Intersistemas AC, 1998.