TRABAJOS ORIGINALES

Rev. Chil. Pediatr. 58(6): 436-441, 1987

Concentraciones de aminoácidos en suero y orina en niños chilenos de 0-6 años de edad

Dr. Jorge Rodríguez O.¹; Q.F. Raquel Pino R.²; Q.F. Edda Costa C.²

Normal serum and urine aminoacid patterns in a Chilean population 0 to 6 years

Inherited errors of aminoacid metabolism are characterized by partial or total enzymatic deficiencies with accumulation of metabolites which reveal an altered metabolic pathway. The diagnosis of these inborn errors needs an available, accurate and reliable laboratory technique. The aim of this study was to develop a gas-liquid chromatographic method for the analysis of aminoacids in biological fluids. This included three main stages: isolation and quantification of aminoacids. Normal serum and urine aminoacid patterns in a Chilean population aged 0 to 6 years old are presented. Normal serum values showed large range variations between traces (Tyrosin) and 1808 $\mu\text{mol/l}$ (Ornityn). Normal aminoaciduria also showed large variation according with age and the particular aminoacid in study.

(Key words: aminoacids, serum levels normal children).

El avance de la bioquímica clínica ha permitido una mejor comprensión de los procesos patológicos, aumentar la precisión en el diagnóstico, despertar el interés por parte del clínico en las denominadas enfermedades congénitas del metabolismo y ampliar el conocimiento acerca de las enfermedades que afectan al metabolismo de los aminoácidos. Estas enfermedades presentan la característica de ser hereditarias como consecuencia de mutación genética de cromosomas encargados de enzimas propias del metabolismo, lo que determina un déficit enzimático parcial o total, produciendo la alteración de una vía metabólica con el consecuente acumulo de un metabolito.¹ Generalmente se manifiestan en la temprana infancia por un cuadro grave, en el cual el diagnóstico es difícil si no se dispone de pruebas bioquímicas específicas. En aquellos pacientes que no han sido diagnosticados y tratados en

forma oportuna, la muerte (forma clásica de la enfermedad olor jarabe de arce en orina) o el retardo mental (fenilcetonuria), se presentan con frecuencia.

El procedimiento de diagnóstico más exacto de una alteración metabólica es la determinación del déficit de la actividad enzimática. Esto requiere generalmente técnicas complejas y de elevado costo.

En lo que se refiere a errores congénitos del metabolismo de aminoácidos, las técnicas de diagnóstico se han basado inicialmente en pruebas cualitativas para orina, diseñadas para determinar la concentración anormal de un metabolito, tales como pruebas del cloruro férrico, cianuro nitroprusiato, 2,4-dinitrofenilhidrazina, prueba para la acidemia metilmalónica, entre otras. Sin embargo estas pruebas colorimétricas no son específicas, siendo sólo capaces de determinar eliminaciones excesivas de algunos aminoácidos². Un resultado positivo requiere necesariamente una investigación bioquímica más profunda que permita separar, identificar y cuantificar el metabolito excretado en forma anormal.

1. Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso.

2. Escuela de Química y Farmacia, Universidad de Valparaíso.

Para superar estas dificultades se han empleado métodos bacteriológicos indirectos³, o en forma más reciente métodos cromatográficos. Estos últimos pueden ser semicuantitativos en el caso de la cromatografía por partición⁴, o cuantitativos en el caso de la cromatografía en columnas de resinas de intercambio iónico⁵, cromatografía-líquido^{6,7} y HPLC.

En nuestro medio, desde el punto de vista de apoyo al diagnóstico, los errores congénitos de metabolismo no se han enfocado en toda su magnitud, a través de técnicas accesibles y confiables, lo cual tiene obvias consecuencias en el tratamiento, pronóstico y consejo genético que dichos pacientes requieren. A nivel nacional, a nuestro conocimiento, sólo se han publicado valores normales de aminoácidos en líquidos biológicos mediante cromatografía en papel⁸, método actualmente insuficiente en el manejo de las aminoacidopatías, según nuestra opinión.

Esto ha motivado la realización de este estudio, cuyo objetivo principal fue establecer valores normales de aminoácidos séricos y urinarios, en una población de niños sanos cuyas edades fluctuaron entre recién nacidos y 6 años de vida.

MATERIAL Y METODO

Se seleccionaron 108 niños sanos de ambos sexos, con consentimiento informado de sus padres, cuyas edades fluctuaron desde 2 días y 6 años de edad, procedentes de jardines infantiles y centros hospitalarios de la V Región. Las muestras de 7 niños que presentaron bacteriuria significativa fueron desechadas, al igual que las de 6 niños que presentaron fiebre hasta dos días después de recolectada la muestra. En 50 niños se obtuvo muestra de sangre y en otros 45 de orina. Los voluntarios se clasificaron en cinco grupos etarios Grupo 1: Recién nacido a 3 meses (RN-3m); Grupo 2: 3 meses a 1 año (3m-1a); Grupo 3: 1 año a 2 años (1a-2a); Grupo 4: 2 años a 4 años (2a-4a); Grupo 5: 4 años a 6 años (4a-6a). Cada grupo estuvo constituido por un número igual de niños. Las muestras de sangre fueron recolectadas en la mañana en un volumen promedio de 3 ml. Inmediatamente formado el coágulo, se procedió a su separación, el suero obtenido se centrifugó a 3000 rpm, durante 10 minutos. La fracción sérica se removió de células y se refrigeró (4°C) hasta ser analizada. Las muestras de orina fresca, fueron sometidas en forma inmediata a pruebas cualitativas (cloruro férrico, Benedict, 2,4-dinitrofenilhidrazina, método de aciduria metilmalónica). Otra parte de la muestra de orina fue refrigerada hasta ser analizada mediante, cromatografía-gas-líquido.

La preparación de las muestras para el análisis cuantitativo, en suero y en orina, comprendió una desproteinización con ácido sulfosalicílico en una con-

centración de 50 mg/ml de suero u orina. La solución se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm. Al sobrenadante se le adicionó el estándar interno Norleucina y se procedió a aislar los aminoácidos a través de una resina de intercambio catiónico (Dowex 50 X8-100). El líquido se recibió en micro ampollas de 3 ml, se esterilizó el grupo carboxilo con una mezcla isobutano-HCL 3,2 m y luego se aciló el grupo amino con una mezcla cloruro de metileno-anhídrido heptefluobutírico. Los N(O,S)-HFB isobutil ésteres de aminoácidos se disolvieron en acetato de etilo y mediante una microjeringa (Hamilton 70 IN) se inyectaron en un cromatóforo (Shimadzu GC-8APF), equipado con doble detector de ionización de llama, horno con doble columna (columnas de vidrio de 3 m x 2,6 mm D.I., rellenas con 3% SE-30 sobre Chrom W HP 80/100 mesh), programador de temperatura, registrador e integrador (Chromatopac C-RIB). El análisis por cromatografía gas-líquido de los N(O,S)-HFB isobutil ésteres de aminoácidos, se desarrolló durante 25 minutos a una temperatura programada entre 100° C y 240° C, con un delta temperatura constante. Las áreas se obtuvieron directamente desde el integrador Chromatopac C-RIB. La identificación preliminar de los picos cromatográficos en suero y orina, se realizó por co-inyección de las muestras biológicas con derivados determinados de aminoácidos y por comparación con los tiempos de retención correspondientes a mezclas estándares. Estos tiempos de retención se utilizaron para identificar cada aminoácido en suero y orina. Para lograr la mayor uniformidad en la identificación de los picos, se determinó además el tiempo de retención relativo (TRR) a Noleucina, para cada aminoácido presente en la mezcla estándar, y estos se compararon con los correspondiente a las muestras de suero y orina. La potencial presencia de diferencias significativas, entre los tiempos de retención de mezclas estándares y muestras biológicas, se determinó a través de la prueba no paramétrica de rangos con signos de Wilcoxon para datos pareados⁹. El cálculo de la concentración de cada aminoácido perteneciente a una muestra problema, se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$AA = \frac{(\text{Area AAP/Area Sip}) \times \text{Area Sist} \times \text{umol AAst}}{\text{RmR} \times \text{Area AAst} \times \text{Vi}}$$

Donde: "RMR" corresponde a la respuesta molar relativa de determinado aminoácido, definida por:

$$\text{RMR} = \frac{\text{Area AAst/umol AAst}}{\text{Area Sist/umol Sist}}$$

AAp = aminoácido en muestra problema
Sip = estándar interno en muestra problema
AAst = aminoácido en mezcla patrón
Sist = estándar interno en mezcla patrón VI
Vi = volumen de muestra antes de el intercambio iónico.

La información fue procesada en el computador IBM 4361 de la Universidad Católica de Valparaíso a través del sistema Minitab UC.¹⁰ Para la determinación de diferencias significativas entre las variables, se utilizó el sistema Statpack¹¹, mediante un microcomputador

Olivetti M 19 del Instituto de Matemáticas y Física de la Universidad de Valparaíso.

RESULTADOS

Los picos correspondientes a los diferentes aminoácidos, tanto en suero como en orina, lograron una adecuada separación y se caracterizaron por ser simétricos. La figura 1 registra la separación cromatográfica de los 14 aminoácidos en estudio y el estándar interno Norleucina, para una mezcla que cumplió todas las etapas del análisis cuantitativo.

La prueba no paramétrica de rangos con signos de Wilcoxon para datos no pareados, indicó que los tiempos de retención de mezclas estándares eran estadísticamente iguales a los de orina (valor $p = 1$), no así los de suero (valor $p = 0$). De igual forma, se aplicó esta prueba a los TRR a Norleucina de cada aminoácido, entre mezclas estándares y muestras biológicas, indicando que eran estadísticamente iguales a orina (valor $p = 0,454$) y suero (valor $p = 0,190$), utilizándose por tanto estos valores para los cálculos posteriores.

El orden de elución de los diferentes aminoácidos concuerda con los reportados en la literatura^{12,13}, y fue el siguiente: alanina, glicina, valina, treonina, leucina, isoleucina, norleucina, prolina, metionina, ácido aspártico, fenilalanina, ornitina, ácido glutámico, lisina y tirosina. Los tiempos de retención para los 14 aminoácidos estudiados fluctuaron entre 9,60 minutos (alanina) y 22,81 minutos (tirosina). Para el cálculo de los valores se empleó la respuesta molar relativa a norleucina, la cual presentó una variación entre 0,526 (valina) y 1,333 (Ac. glutámico). El valor promedio de la concentración sérica, rango y desviación estándar para cada aminoácido en 50 niños sanos, cuyas edades fluctuaron entre RN y 6 años, es presentada en la figura 2.

Los perfiles séricos mostraron concentraciones elevadas de ácido glutámico, alanina y tirosina. Las mayores desviaciones estándares las presentan tirosina (DE = 422,5) y ornitina (DE = 413,5).

La figura 3 relaciona las concentraciones promedio de los aminoácidos séricos entre los diferentes grupos etarios. En esta figura se aprecia que: ornitina, lisina, ácido aspártico y

Figura 1: Separación cromatográfica de los N (O,S)-HFB Isobutil ésteres de aminoácidos en estudio. Columna rellena 3%SI-30 (Mezcla estándar de aminoácidos).

nle: estándar interno norleucina
ala: alanina
gli: glicina
val: valina
tre: treonina
leu: leucina
ile: isoleucina
pro: prolina
met: metionina
asp: ac. aspártico
fen: fenilalanina
orn: ornitina
glu: ac. glutámico
lis: lisina
tir: tirosina

Figura 2: Concentraciones promedios ($\bar{x}$), rangos (r) y desviaciones estándares (d.s.) de los aminoácidos séricos en 50 niños sanos (RN-6 años).

Figura 3: Variación de la concentración sérica promedio de 12 aminoácidos en los diferentes grupos etarios estudiados.

ácido glutámico presentan las mayores fluctuaciones entre los diferentes grupos etarios. Treonina es el aminoácido que presenta la concentración más baja en todos los grupo etarios. Ornitina es el aminoácido que presenta la mayor concentración en los grupos etarios (RN-1a). Alanina se presenta en mayor concentración en los grupos etarios (1a-4a). Ácido glutámico y glutamina se encuentran en mayor concentración en los grupos (RN-3m) y (4a-6a). Treonina e isoleucina siguen un comportamiento similar entre los grupos (RN-4a) mientras que en el grupo (4a-6a), los niveles de treonina disminuyen y los de isoleucina aumentan. Metionina (222 mMol/l) y tirosina (539 mMol/l) presentaron promedios prácticamente iguales en los diferentes grupos etarios estudiados, aún cuando la variación dentro de cada grupo etario fue significativa.

La figura 4 presenta las concentraciones promedios, rangos y desviaciones estándar, para

Figura 4: Concentraciones promedios ($\bar{x}$), rangos (r) y desviaciones estándares ($d.s.$) de los aminoácidos urinarios en 45 niños sanos (RN-6 años) expresados en milimoles por litro.

Figura 5: Variación de la concentración urinaria promedio de 11 aminoácidos en los diferentes grupos etarios estudiados.

catorce aminoácidos presentes en orina de 45 niños sanos cuyas edades fluctuaron entre recién nacidos y seis años. El perfil urinario presentó

concentraciones elevadas de glicina, aminoácido que posee a su vez, la mayor de las desviaciones estándar ($DE=1020$).

La figura 5 relaciona las concentraciones promedios de los aminoácidos urinarios entre grupos etarios. En la figura se puede observar que: glicina es el aminoácido en mayor concentración en todos los grupos etarios, alanina, treonina, ácido aspártico y lisina, presentan un comportamiento similar entre grupos etarios sin grandes fluctuaciones en sus concentraciones. Isoleucina es el aminoácido en menor concentración en la mayoría de los grupos, a excepción del grupo (3m-1a). Fenilalanina presentan su mayor concentración en el grupo (2a-4a), al igual que ornitina. En dicha figura no se presentan tres aminoácidos (prolina, metionina, tirosina), que mostraron un comportamiento promedio muy estable en los diferentes grupos etarios. El promedio de excreción urinaria de dichos aminoácidos para el total de niños fue de 97,8 mMol/l para prolina, 110,5 mMol/l para metionina y 123,8 mMol/l para tirosina.

DISCUSION

La etapa preliminar de la investigación comprendió el análisis cualitativo de las muestras de orina de todos los pacientes. Dichas pruebas resultaron negativas en todos los casos. Es bien conocido que dichas pruebas pueden dar como resultado falsos negativos o positivos. Frente a la sospecha clínica se deben repetir aquellos que resulten negativos. Si la prueba es positiva, se identificarán y cuantificarán los metabolitos de excreción anormal mediante una técnica de mayor resolución.

La cromatografía gaseosa, frente a otras técnicas cuantitativas empleadas en el laboratorio clínico, presenta la ventaja de una gran versatilidad del instrumento, gran exactitud a concentraciones muy bajas y la posibilidad de combinar con espectrometría de masa para determinar la estructura química de metabolitos no identificados.

En nuestro medio los métodos de cromatografía gaseosa han sido previamente utilizados en el reporte de errores congénitos de metabolismos del grupo de las acidurias orgánicas¹⁴.

En la interpretación de los datos cuantitativos de aminoácidos, se debe tener presente como

posible factor de error, el efecto de venipunturas repetidas, mantención prolongada de la muestra a temperatura ambiente, retraso en la desproteínización de la muestra, contaminación con células sanguíneas y hemólisis^{15,16}.

En el caso de la orina, la presencia de enzimas liberadas de tejido renal dañado o la contaminación con bacterias puede incrementar los aminoácidos por hidrólisis de péptidos y proteínas. Se ha demostrado que la presencia de microorganismos en orina, que contienen hipuricasa, la cual desdobla el ácido hipúrico en ácido benzoico y glicina, eleva los niveles de glicina sobre los normales¹⁷.

Los niveles de aminoácidos pueden presentar variaciones significativas por procesos metabólicos no relacionados con una aminoacidopatía primaria, tales como el estado nutricional, las variaciones circadianas y la infección. Es posible observar diferencias importantes en los patrones de excreción de aminoácidos en orina de sujetos sanos, como consecuencia de hábitos alimentarios. Por otra parte, existen variaciones naturales en la concentración de los aminoácidos según los grupos etarios. En la orina del neonato hay más aminoácidos en base fundamentalmente a glicina. La aminoaciduria denominada fisiológica del prematuro es frecuente y atribuida a inmadurez renal.

Una anomalía en la excreción de aminoácidos por la orina puede afectar a un aminoácido, a un grupo de los mismos o a todos ellos (Síndrome de Fanconi). Las causas de la excreción anormal de un aminoácido son múltiples y varían desde estados catabólicos hasta enfermedades en las cuales existe un déficit específico en la reabsorción tubular de algunos aminoácidos (cistinuria). Por tanto cualquier hallazgo inusual en los niveles de aminoácidos urinarios, debe ser confrontado con la clínica y eventualmente decidir una determinación sérica.

Durante el presente trabajo una serie de muestras correspondientes a enfermedades tales como fenilketonurias, hiperamonemia por déficit de ornitina transcarboxilasa (OTC) ligada al sexo, acidemia metilmalónica (déficit de succinil CoA transferasa)¹⁸, e hiperalaninemia, fueron estudiadas en nuestro laboratorio. Debe ser destacado que en todos estos pacientes, algunos de los cuales serán objeto de un posterior reporte, la excreción de aminoácidos en orina fue significativamente diferente a lo señalado como normal en el presente trabajo.

RESUMEN

Los errores congénitos del metabolismo de los aminoácidos se caracterizan por un déficit enzimático parcial o total, que determina la alteración de una vía metabólica con el consecuente acúmulo de un metabolito. El diagnóstico requiere técnicas de laboratorio exactas confiables, y accesibles.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método por cromatografía gas-líquido para el análisis de aminoácidos en fluidos biológicos. Las principales etapas del procedimiento experimental fueron aislamiento, derivatización y cuantificación de aminoácidos.

Se establecieron valores normales de aminoácidos en suero y orina en una población chilena desde recién nacidos a 6 años de edad. Las concentraciones séricas mostraron un amplio rango de variación entre trazas (tirosina) y 1808 μmol (ornitina). La aminoaciduria normal también presentó una gran variación dependiente de la edad y el tipo de aminoácido en estudio. Estos valores normales son un elemento necesario en la interpretación de la patología.

REFERENCIAS

1. Stanbury J., Wynaarden J., Fredrickson D., Goldstein J., Brown M.: En: The Metabolic basis of inherited disease. Mc Graw-Hill Book Co. New York. 3ta edic. pag. 7, 1983.
2. Scriver Ch., Rosenberg L.: En: Metabolismo de los aminoácidos y sus trastornos, Edit. Científico Médica Madrid, pag. 144, 1979.
3. Guthrie R. and Susi A.: A simple phenylalanine method for detection phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatric* 32: 338, 1963.
4. Datta S.P., Dent C.E., Harris H.: An apparatus for simultaneous production of many two-dimensional paper chromatograms. *Science* 112: 621, 1950.
5. Moore S., Spackman D.H., Stein W.H.: Chromatography of aminoacids on sulfonated polystyrene resins. *Anal Chem* 30: 1185, 1958.
6. Darbre A. and Islam A.: Gas-liquid chromatography of trifluoroacetylated amino acid methyl esters. *Biochem J.* 106: 923, 1968.
7. Zumwalt R.W., Kuo K., Gehrke C.W.W.: Applications of a gas-liquid chromatographic method for amino acid analysis. A system for analysis of nanogram amount. *J Chromatogr* 55: 267, 1971.
8. Escobar C., Colombo M., Jones K., Arevalo L.: Aminoaciduria en población infantil normal de 0 a 6 años. *Rev Chil Pediatr* 48: 82, 1976.
9. Hollander M. and Wolfe D.: Nonparametric statistical methods. Ed. John Wiley & Sons, New York, pag. 27, 1973.
10. Rodríguez G.: Estadística descriptiva. En: Computación estadística interactiva: El sistema MINITAB-UC. Dpto. Estadística, Facultad de Matemáticas, Pontificia Universidad Católica de Chile, pag. 41, 1986.
11. Statpack N.: Single-variable statistic. En: multi-function statistics library. Versión 3.1., Northwest Analytical, Inc. Portland, Oregon, pag. 9.1, 1984.
12. Mackenzie S. and Tenaschuk D.: Quantitative formation of N (O,S)-heptafluorobutyl isobutyl amino acids for chromatographic analysis: Acylation. *J Chromatogr* 173: 53, 1979.
13. Mackenzie S. and Tenaschuk D.: Quantitative formation of N (O,S)-heptafluorobutyl isobutyl amino acids for gas chromatographic analysis: Esterification. *J Chromatogr* 173: 53, 1979.
14. López L., Rodríguez J., Bravo P., Bocic J.: Análisis por cromatografía gas-líquido de metabolitos urinarios de interés diagnóstico en acidemias orgánicas. Resúmenes de trabajos y conferencias. Primer encuentro nacional de química analítica. Concepción. pag 53, 1987.
15. Soupart P.: Free amino acids of blood and urine in the human. In Holden, J. T., ed. Amino Acid Pools. Elsevier, New York, pag 220, 1962.
16. Rouser G., Jelinek B., Samuels A. J. and Kinugasa K.: Free amino acids in the blood of man and animals. Method of study and the effects of venipuncture and food intake on blood free amino acids. In Holden, J.T., ed., Amino Acid Pools. Elsevier, New York, pp 350, 1962.
17. Halpern B., Pereira N., Solomon M., Steed E.: A rapid and quantitative gas chromatographic analysis for phenylalanine in serum. *Anal Bioch* 39: 156, 1971.
18. García A., Rodríguez J., Pino R.: Acidemia Metilmalónica: a propósito de un caso. Resumen de trabajos. XI Jornadas de la Sociedad Chilena de Pediatría, pag 79, 1985.