NIVELES DE AMINOACIDOS PLASMATICOS EN DISTINTOS GRUPOS DE

EDAD Y SEXO : SUS ALTERACIONES EN EL STRESS

Memoria presentada por D. JOSE JOAQUIN VARGAS MARTINEZ para optar al grado de DOCTOR en Medicina por la Universidad de GRANADA.

D. FERNANDO PERAN MESA, DOCTOR EN FARMACIA Y ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DE LA C. S. "VIRGEN DE LAS NIEVES"

CERTIFICA: Que la Tesis que presenta al superior juicio del tribunal que designe la Universidad de Granada, D. JOSE JOAQUIN VARGAS MARTINEZ, sobre el tema : NIVELES DE AMINOACIDOS PLASMATICOS EN DISTINTOS GRUPOS DE EDAD Y SEXO : SUS ALTERACIONES EN EL STRESS.

ha sido realizada bajo nuestra dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que la hacen acreedor del grado de Docotr siempre que asi lo considere el citado tribunal.

Granada a 22 de Junio de 1988

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquimica y Biologia Molecular

Granada,

DON ENRIQUE GARCIA OLIVARES, PROFESOR TITULAR DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA: Que la Tesis presentada por D. JOSE JOAQUIN VARGAS MARTINEZ sobre el tema: NIVELES DE AMINOACIDOS PLASMATICOS DE DISTINTOS GRUPOS DE EDAD Y SEXO: SUS ALTERACIONES EN EL STRESS.

y siendo yo ponente de la misma la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor ante el Tribunal que le ha sido designado.

Granada a de Septiembre de 1988

Enrique Garcia Olivares
Prof. Titular

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 19 87 a 19 88 Folio 31 vta Número 62

Reunido en el dia de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. José Joaquín Vargas Martínez, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente habia elegido: Niveles de aminoácidos plasmáticos en distintos grupos de edad y sexo: Su alteración en el estrés

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de APTO 'CUM LAUDE'

Granada 9 de Septiembre de 1988

EL PRESIDENTE,

Fdo.: J.A. Gomez Espelta

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: FEDERICO GARRIDO

EL VOCAL,

Fdo: RICARDO VILCHEZ JOYA

EL VOCAL,

Fdo.: Salvador Roza

EL VOCAL,

Fdo.: J.R. Arnaiz Navarro

FIRMA DEL GRADUANDO,

PONENTE: Dr. D. Enrique Garcia Olivares, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada. Linea de investigación en Inmunologia de la reproducción y Secretario del Departamento de Bioquimica y Biologia Molecular.

Granada a 7 de Julio de 1988

Enrique Garcia Olivares
Secretario del Departamento de
Bioquimica y Biologia Molecular

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. FEDERICO GARRIDO TORRES-PUCHOL por la confianza que ha depositado en mi y por su ayuda inestimable sin la cual hubiera sido imposible la lectura de esta tesis.

Al Doctor D. FERNANDO PERAN MESA por las innumerables horas que ha estado junto a mi y ha posibilitado la realización de esta tesis.

Y en general a todas aquellas personas que me ayudaron directa o indirectamente en la consecución de mis objetivos , destacando a D. ANTONIO MURILLAS por su experta e inestimable ayuda en el campo de la estadistica.

A mi mujer María Dolores, por su constante estímulo y aliento.

0. INDICE

INDICE

I.- INTRODUCCION ..... 1 pag.

II.- OBJETIVOS 5

III.-REVISION BIBLIOGRAFICA 7

III.1.- Aminoácidos: Absorción y destinos metabólicos 8

III.1.1.- Aminoácidos libres en plasma 10

III.1.2.- Metabolismo hepático de los aminoácidos 11

III.1.3.- Metabolismo muscular de los aminoácidos 13

III.2.- Factores que influyen en el metabolismo de los aminoácidos 15

III.2.1.- Influencia de la ingesta 15

III.2.2.- Influencias hormonales 17

III.2.2.1.- Hormona del crecimiento 18

III.2.2.2.- ACTH 18

III.2.2.3.- Catecolaminas 19

III.2.2.4.- Glucocorticoides 21

III.2.2.5.- Esteroides sexuales 22

III.2.2.6.- Hormonas pancreáticas 23

III.3.- Factores patológicos que modifican el metabolismo de los aminoácidos 26

III.3.1.- Niveles plasmáticos de aminoácidos en

el stress 27
III.3.2.- Metabolismo hepático y muscular de los aminoácidos en el stress 30
III.3.3.- Interrelaciones endocrino-metabólicas en el stress 32
III.3.4.- Metabolismo de los aminoácidos en politraumatizados 38
III.4.- Aminoácidos totales Fraccionamiento de Aa ... 39
III.4.1.- Métodos químicos de fraccionamiento 41
III.4.2.- Métodos microbiológicos 46
III.4.3.- Métodos electroforéticos 48
III.4.4.- Métodos cromatográficos 50
III.4.4.1.- Cromatografía de partición en papel ... 50
III.4.4.2.- Cromatografía en capa fina 51
III.4.4.3.- Cromatografía de gases 52
III.4.4.4.- Cromatografía de cambio iónico 53
III.4.4.5.- Cromatografía líquida de alta presión 54
IV.- MATERIAL 59
IV.1.- Muestras clínicas 60
IV.1.1.- Establecimiento de valores de referencia.. 60
IV.1.1.1.- Sujetos estimulados con ACTH 61
IV.1.1.2.- Individuos sometidos a stress físico... 61
IV.2.- Material utilizado en el análisis de Aa ... 63
IV.2.1.- Reactivos 63
IV.2.1.1.- Soluciones de referencia 63
IV.2.1.2.- Fases móviles 64

IV.2.1.3.- Reactivos de desproteinización 64
IV.2.1.4.- Reactivos de detección 64
IV.2.1.5.- Análisis hormonales 65
IV.2.2.- Material fungible 65
IV.2.3.- Material inventariable 65
IV.2.3.1.- Cromatógrafo líquido-líquido 66
IV.2.3.2.- Medida de volumen 67
IV.2.3.3.- Medida de radiactividad 67
V.- METODOS 68
V.1.- Metodo general de estudio 69
V.2.- Preparación de reactivos 70
V.2.1.- Tampones 70
V.2.2.- Reactivos de trabajo 71
V.2.2.1.- Preparación de muestras 71
V.2.2.2.- Separación de aminoácidos 72
V.2.2.3.- Detección 73
V.3.- Medida de la precisión 73
V.4.- Selección de pacientes 74
V.5.- Obtención de muestras 76
V.6.- Análisis de aminoácidos 76
V.6.1.- Preparación de la muestra 77
V.6.2.- Separación de aminoácidos 78
V.6.3.- Detección 80
V.6.4.- Valoración 81
V.7.- Análisis de cortisol 82
V.8.- Métodos estadísticos 82

VI.-RESULTADOS 84

VI.1.- Características del método empleado 85

VI.2.- Valores de referencia de Aa 88

VI.3.- Relaciones entre los grupos estudiados 95

VI.3.1.- Relaciones entre los aminoácidos plasmáticos de diferentes grupos de población 96

VI.3.2.- Diferencias entre los Aa. plasmáticos de los grupos de población estudiados 100

VI.3.3.- Causas de las diferencias observadas 103

VI.4.- Modificaciones de los Aa. plasmáticos inducidas por el stress 105

VI.4.1.- Administración de ACTH,TCE y niveles de Aa. en plasma 107

VI.4.2.- Relaciones entre los Aa. plasmáticos tras administración de ACTH y tras TCE 110

VI.5.- Relación entre las variaciones en los niveles de Aa. plasmáticos en individuos sometidos a stress 120

VII.-DISCUSION 121

VII.1.- Marco de la presente investigación 122

VII.2.- Análisis de aminoácidos 124

VII.3.- Valores de referencia de los aminoácidos plasmáticos 126

VII.3.1.- Relaciones entre los Aa. plasmáticos 129

VII.4.- Influencia del stress inducido en los niveles plasmáticos de aminoácidos 133

VII.5.- Efectos de los aminoácidos plasmáticos en sujetos en estado de stress a debido a un traumatismo craneoencefálico puro 135

VIII.- CONCLUSIONES 137

IX.- BIBLIOGRAFIA 140

I.- INTRODUCCION.

La principal función de los aminoácidos presentes en los seres vivos, es su utilización como punto de partida en la síntesis de proteínas,de diversas substancias nitrogenadas y, su incorporación en multiples vías metabólicas.

La capacidad de todas las células para regular esta síntesis depende de la continua disponibilidad de un depósito circulante de aminoácidos,equilibrado con los requerimientos de dichas células. Dicho deposito o "pool" de aminoácidos, procede tanto de la hidrólisis de las proteínas como de las que ingiere el organismo por el aporte alimenticio. El citado pool de aminoácidos está sometido a multiples influencias, desde las debidas a factores hormonales, a las más meramente fisiológicas como tipo de dieta,ritmo circadiano,edad, sexo y un largo etc.Igualmente este pool de aminoácidos se puede alterar por muy diversas circunstancias, por ejemplo: enfermedades infecciosas y metabólicas ,traumatismos y en general cualquier circunstancia que suponga un estado de stress físico ó psiquico.

Son clásicas, por otra parte,las alteraciones del metabolismo de los aminoácidos, que conducen a patologías bien descritas y definidas.

Por lo expuesto anteriormente,es interesante poder determinar de una manera rápida y fiable las concentraciones de los aminoácidos plasmáticos.Para poder utilizar dichos datos en el establecimiento de diagnóstico clínico es muy importante disponer de unos valores de referencia con los cuales poder establecer comparaciones.

Para el estudio de los niveles de aminoácidos en muestras biológicas se han utilizado multitud de técnicas, desde Folling, que observó, que soluciones de ciertos aminoácidos, como la fenilalanina y sus metabolitos,eran capaces de reaccionar con el percloruro de hierro dando una coloración verde azulada,a la de Guthrie que puso a punto un test de tipo microbiológico que permitia valorar la fenilalanina en muestras biológicas.

No obstante fueron las técnicas cromatográficas de distintos tipos las que impulsaron definitivamente este tipo de análisis, llegándose con el empleo de la cromatografía de cambio iónico,al diseño y utilización de sistemas automatizados que permitieron la utilización rutinaria de estas determinaciones en los laboratorios.

Hoy en dia se dispone de cromatógrafos liquidos de alta presión,mediante los cuales se ha logrado la determinación de aminoácidos,en tiempos reducidos y con errores minimos.

Es, por otra parte, un hecho ampliamente establecido que el stress altera los niveles de una serie de hormonas y de mediadores químicos,por lo cual nos planteamos el estudio de las modificaciones de los niveles de los aminoácidos plasmáticos que se producen en pacientes afectados por él,como es el caso de los que sufren un traumatismo craneoencefálico puro (sin afectación de masa muscular).

Como paso intermedio para este estudio intentamos reproducir parte de los aspectos endocrinos del stress metabólico, mediante la administración de ACTH i.v. en sujetos voluntarios, determinandose en ellos, los niveles de aminoácidos plasmáticos pudiéndose establecer asi, una comparación entre el perfil de aminoácidos plasmáticos de voluntarios con stress inducido y el de pacientes con un traumatismo craneoencefálico puro.

II.- OBJETIVOS DE LA TESIS.

Como objetivo fundamental de nuestro trabajo, nos hemos planteado el estudiar las alteraciones en las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos durante el stress; para ello hemos seguido el siguiente esquema de trabajo:

1.- Establecimiento de los valores de referencia de los aminoácidos plasmáticos en la población normal, dividida por grupos de edad y sexo y de las posibles diferencias entre dichos grupos.

2.- Estudio de las variaciones en las concentraciones de aminoácidos plasmáticos, inducidas mediante la administración de ACTH intravenoso, simulando así algunos aspectos hormonales del stress.

3.- Estudio de las posibles alteraciones de los niveles de aminoácidos plasmáticos debidas al stress físico inducido por los traumatismos craneoencefálicos.

III.- REVISION BIBLIOGRAFICA.

III.1.- AMINOACIDOS: ABSORCION Y DESTINOS METABOLICOS.

Los aminoácidos, son las sustancias de partida en la síntesis de importantes componentes celulares y sustancias activas; previamente desaminados, pueden entrar en el metabolismo de los hidratos de carbono y de las grasas tanto desde el punto de vista anabólico como del catabólico.

La clasificación de los aminoácidos como esenciales y no esenciales, no se realizó hasta despues del descubrimiento de la Treonina por Mc Coy (1) a partir del cual y mediante la preparación de dietas en las que se reemplazaba a las proteinas por mezclas de aminoácidos que eran capaces de mantener el metabolismo humano Rose (2) distinguio los que podian ser sintetizados en el organismo de los mamiferos,de los que era preciso que se aportaran con la alimentación. No obstante hasta finales de los años 40 no se pudo completar la relación de los aminoácidos que son nutricionalmente esenciales para los humanos, relación que comenzó a confeccionarse en 1906 cuando Wilcok (3), descubrio que los roedores precisaban del triptofano en su dieta para mantener su normal desarrollo, lo que fue posteriormente confirmado por Osborne (4) que demostró tambien la naturaleza esencial de la Lisina y de algunos aminoácidos azufrados.

Aunque hasta hace poco tiempo se pensaba que solo los

aminoácidos libres procedentes de la digestión de las proteínas, se absorbían en el intestino, hoy se ha podido establecer que peptidos pequeños pueden ser captados por las células de la mucosa del intestino delgado, en el interior de las que se hidrolizan y pasan al torrente circulatorio en forma libre. Un hecho cierto, es que la absorción de aminoácidos,se realiza exclusivamente a nivel del intestino delgado (5), mediada por mecanismos de transporte activo muy específicos. Se ha sugerido (6), que los grupos amino y carboxilo del aminoácido deben estar libres para que el transporte sea efectivo, así mismo es necesaria la existencia de metabolismos aerobios productores de energía ya que la absorción se realiza en contra de gradiente y, por consiguiente, con consumo energético como lo prueba el que estos tipos de transporte sean anulados por la anoxia y por inhibidores de la fosforilación oxidativa

Una vez absorbidos, los aminoácidos, pasan a la vena porta,y en pequeña cantidad a los linfáticos, a partir de los que son distribuidos por el organismo y captados, activamente por todos los organos.

Según Munro (7), los aminoácidos pueden ser utilizados en el organismo en condiciones normales para:

A) El aporte de materiales básicos para la síntesis de proteinas en todos los tejidos. La cantidad de proteinas que son sintetizadas diariamente por el ser humano adulto es de cerca de 300 g (8). Los aminoácidos circulantes utili-

zados en dicha síntesis proceden, tanto de la hidrólisis de las proteínas circulantes y tisulares, como de la digestión de las proteínas alimentarias.

B) Los aminoácidos, son los precursores de pequeñas moléculas nitrogenadas que se encuentran en múltiples organos, como ejemplos pueden citarse las síntesis de creatina, de muy diversas hormonas etc, en las que diversos aminoácidos intervienen como precursores.

C) Los aminoácidos en exceso, sufren una degradación, y su cadena hidrocarbonada se incorpora al metabolismo energético, el grupo ó grupos amino se eliminan en forma de urea por medio de una reacción secuencial localizada casi exclusivamente en el hígado. Mucho del nitrógeno aportado a esta síntesis es transportado desde otros tejidos en forma de aminoácidos no esenciales, sobre todo alanina y glutamina.

III.1.1.- AMINOACIDOS LIBRES EN PLASMA

Al mismo tiempo que se esta produciendo la absorción de aminoácidos procedentes de las proteínas de la dieta, la mayor parte de las proteínas tisulares sufren una degradación permanente, liberando sus aminoácidos que se incorporan a la

circulación y que constituyen, en conjunto, un reservorio que se conoce con el nombre de "pool de aminoàcidos". De este reservorio (integrado por la degradación de 400 g/dia de proteínas), las células toman los aminoácidos que necesitan para sintetizar nuevas proteínas.

El mantenimiento del equilibrio dinámico celular, en el que juegan un papel importante los aminoácidos, esta múltiplemente regulado por numerosos mecanismos endocrino-metabólicos de entre los que revisaremos los que ocurren, de manera básica, en hígado y músculo, pues si bien los aminoácidos se utilizan en todos los tejidos del organismo, pueden tomarse como referencia las influencias que inducen en el "pool" de aminoácidos los procesos metabólicos que se desarrollan en los citados organos.

III.1.2.- METABOLISMO HEPATICO DE AMINOACIDOS.

En el hígado, y durante un periodo de 12 h., aproximadamente el 60% de los aminoácidos absorbidos siguen vias catabólicas, eliminandose su grupo amino como urea, del 40% restante, la mitad se utiliza en la sintesis de proteinas plasmáticas (albúmina principalmente) ó intracelulares y, por último, el otro 20% se secreta a la circulación general en forma de aminoácidos libres. Esta secreción, que está fuertemente regulada por mecanismos que implican la existencia de vias degradativas (9)(10), está constituida, casi exclusivamente, por

aminoácidos de cadena ramificada,hecho probado por Felig (11) que midiendo flujos de aminoácidos a través del hígado,comprobó como mas del 70% de los medidos a la salida del mismo eran de cadera ramificada,siendo solo del 20% su proporción a la entrada,estas variaciones son debidas,según este autor, al consumo selectivo de aminoácidos que se realiza en dicho organo.La gráfica(1), representa el esquema de lo anterior.

III.1.3.- METABOLISMO MUSCULAR DE AMINOACIDOS.

El músculo esquelético, ha sido considerado de forma clásica, desde el punto de vista metabólico, como un reservorio inerte que contenía grandes cantidades de aminoácidos que podían ser movilizados en ciertas condiciones tales como el ayuno ó ciertos periodos del stress. Según esto, los aminoácidos contenidos en el músculo serían exclusivamente utilizados como precursores de la síntesis de proteínas.

Se ha comprobado por diversos autores, (12)(13), que la célula muscular esoulética, es sumamente activa en el catabolismo de diversos aminoáciodos (especialmente los de cadena ramificada); así como en la síntesis de otros (alanina y glutamina fundamentalmente) y que estos procesos no son solo importantes para la función muscular, sino tambien en la síntesis de proteínas y balance energético del organismo.

La primera indicación de que el músculo representa un

importante papel en la síntesis y degradación de aminoácidos fue publicada en 1960 por Miller (14), que comprobó como la leucina, isoleucina y valina, eran degradadas a similar velocidad por ratas control y ratas hepatectomizadas. Otros autores (15), han demostrado que el diafragma aislado de rata es capaz de degradar muy rapidamente aminoacidos de cadena ramificada, y tambien incorporar estos aminoácidos a proteinas tisulares; esta capacidad metabólica, está limitada a muy pocos aminoácidos. En condiciones absortivas postpandriales, la entrada de los aminoáciods citados a la célula muscular, está mediada por la acción de la insulina, secretada como respuesta al aumento de la glucemia.(16)(17).

La degradación de los aminoácidos de cadena ramificada se incrementa de forma muy marcada en estados catabólicos (18), principalmente en los que se incluye una disminución de la síntesis proteica, así,en ratas mantenidas en ayuno prolongado se ha demostrado (12) un aumento de 3 a 5 veces en las velocidades de oxidación de leucina, isoleucina y valina por el músculo y estos efectos pueden ser frenados e incluso invertidos realimentando a los animales en experimentación.

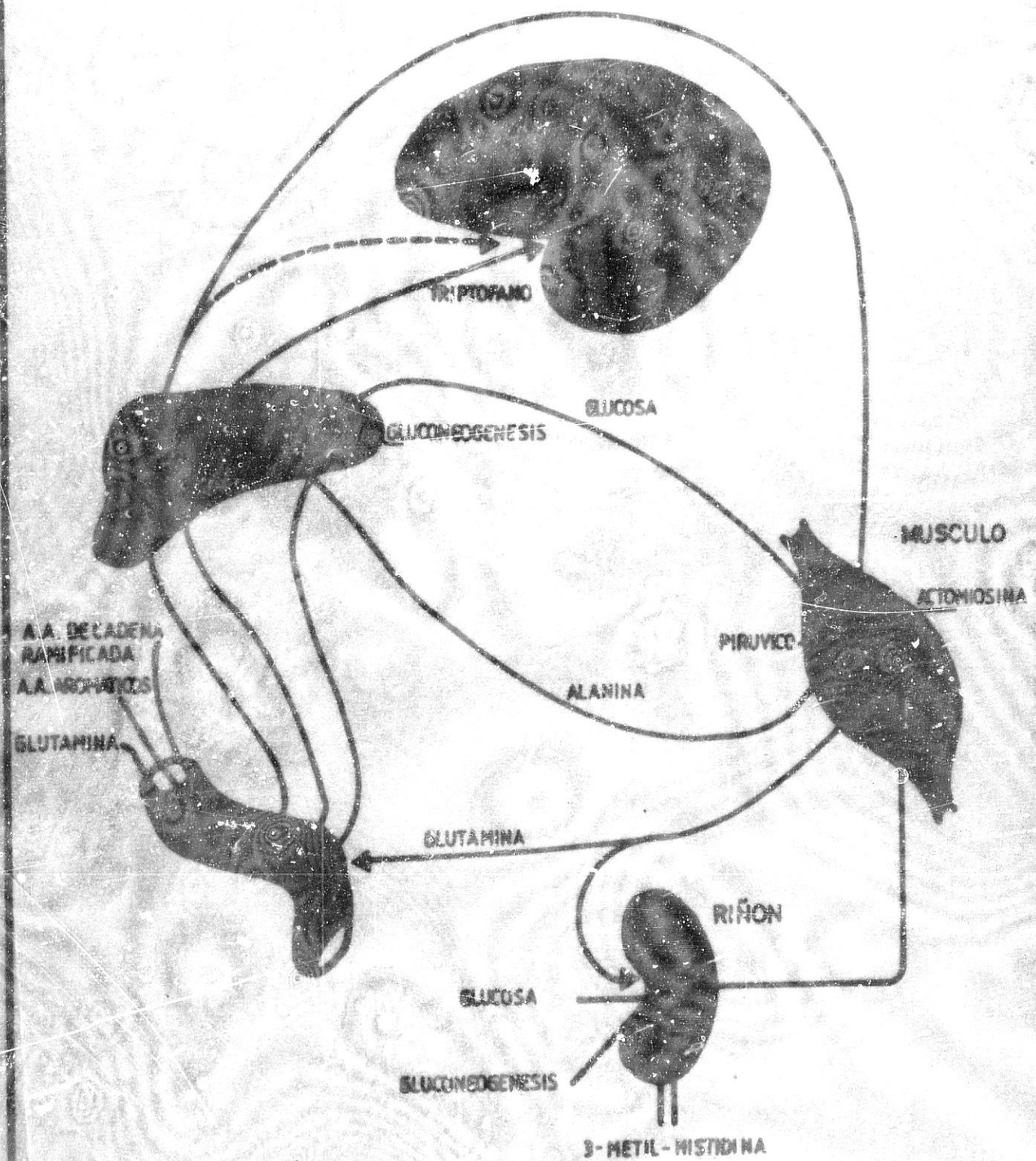
El paso limitante de la oxidación de estos aminoácidos es el de la descarboxilación del acido cetoisocaproico del que la leucina es precursor inmediato (19). Este hecho,sugiere que el citado aminoácido puede actuar como regulador del recambio metabólico de las proteinas del músculo.

El exceso de aminoácidos de cadena ramificada no utili-

zados en vías catabólicas,no queda como tal en la célula muscular (20), sino que se utiliza para la síntesis de otros aminoácidos no esenciales necesarios en la síntesis de proteínas musculares. Buse, (19), trabajando con voluntarios humanos, comprobó que a consecuencia del aumento de leucina plamática que sigue al consumo de proteínas, la musculatura libera grandes cantidades de alanina y glutamina. Resultados de estudios de diferencias arterio-venosas realizados por Felig (20), indican que la síntesis de estos aminoácidos ocurre dentro del músculo y que, una vez liberados al torrente sanguíneo, son captados por el hígado donde son el sustrato de las vías gluconeogénicas. Livesey (21), ha encontrado midiendo flujo de aminoácidos a través del brazo, que la producción de glutamina no se afectaba por la absorción de gran cantidad de aminoácidos de cadena ramificada, mientras,si que se reducían los niveles de alanina, hecho que podía ser invertido por la perfusión con leucina. Los citados resultados, apoyados por Felig (22), confirman los de Mötil (15) sobre el papel regulador de este aminoácido.

La liberación de alanina y glutamina por la célula muscular, puede ser estimulada por otros factores. Así Golostein (23) ha demostrado que, en la acidosis inducida por administración de cloruro amónico ó por la diabetes experimental, la liberación de glutamina por parte del músculo se elevaba, esta glutamina extra era captada, prácticamente en su totalidad

A.A. de cadena ramificada



GRAFICA 1

trada neta de los mismos, que son utilizados para el aporte de nitrógeno a la síntesis de nuevos aminoácidos (alanina y glutamina fundamentalmente).

Por otra parte, Martin (20), ha demostrado una disminución en los niveles de aminoácidos neutros presentes en plasma tras la ingestión de dosis crecientes de glucosa, habiéndose comprobado al mismo tiempo una elevación en los niveles de triptófano, hechos que considera ligados el autor citado, al aumento de la liberación de insulina y que relaciona con la síntesis cerebral de serotonina.

Por otra parte, es bien sabido, que la eficacia de los mecanismos de retención de proteína ingerida, decae en cuanto que el nivel de consumo se acerca al que se necesita para mantener el equilibrio de Nitrógeno del organismo. Por encima de este nivel, el incremento en la retención de nitrógeno en relación con el aumento de consumo, es bastante bajo (31 ,32b, 32c,32d,32e,32f,32g,32h),y depende directamente de la cantidad de proteína ingerida, como ha podido probarse al haberse observado cambios en la velocidad de transferencia de leucina entre el plasma y los tejidos en fases postabsortivas de dietas equilibradas, y la disminución e incluso la inversión de dicha velocidad en dietas hipocalóricas ó hipoprotéicas.

III.2.2.- INFLUENCIAS HORMONALES.

Las rutas metabólicas de los aminoácidos, así como sus niveles plasmáticos, se regulan fundamentalmente, a través de mecanismos musculares y hepáticos, que están,muy a menudo,decisivamente regulados por diversas hormonas.

Dada la importancia que en este trabajo tienen algunos de estos mecanismos,revisaremos a continuación los que consideramos mas importantes.

III.2.2.1.- HORMONA DEL CRECIMIENTO.

La hormona del crecimiento, es el agente anabólico mas potente de entre los conocidos, Wilmore (33), ha demostrado que se produce una fuerte elevación en la retención de nitrógeno a continuación de la administración de HGH. Esta hormona estimula tambien la retención de potasio y de fósforo, activa la lipolisis, la cetogénesis,la oxidación de acidos grasos y la síntesis de condroitin sulfato y colágeno, es inhibidora de la insulina, facilita la captación y utilización de glucosa por la célula muscular.

La secreción hipofisaria de HGH es estimulada por la ingestión de dietas ricas en proteinas y por el aumento de determinado aminoácidos (especialmente arginina) y,a su vez, es capaz de aumentar de forma muy sensible la captación de ami-

noácidos por las células hepáticas y musculares y su incorporación a proteinas.

La regulación de su secreción se ejérce a multiples niveles neurales, metabólicos y endócrinos, algunas de sus acciones están mediadas por la(s) somatomedina(s).

III.2.2.2.- ACTH.

Aparte de la acción corticotropa, fundamental de la ACTH, a través de la cual influye decisivamente sobre el metabolismo celular, esta hormona posee diversas acciones extraadrenales, como son la lipolitica y la hipoglucemiante, atribuidas a una acción directa sobre la liberación de insulina por la célula beta pancreática. Así mismo, grandes dosis de ACTH estimulan la secreción de hidratos de carbono por el hígado, fomentan el transporte de glucosa y aminoácidos al interior de las células musculares, y en animales hipofisectomizados, disminuyen la degradación hepática del cortisol prolongando su vida media plasmática. No obstante, salvo en el caso de pacientes con tumores secretores de esta hormona, es improbable que sus niveles circulantes sean suficientes para mantener estos efectos.

III.2.2.3.- CATECOLAMINAS.

La adrenalina y la noradrenalina, son segregadas en el

organismo como resultado de una gran variedad de estimulos y actuan de manera ligeramente diferente en la regulación del metabolismo, debido a lo cual, la respuesta biológica de un sistema determinado a la activación adrenérgica está determinada en gran medida por el tipo ó tipos de receptores adrenérgicos que existan en el mismo.

Los mecanismos adrenérgicos, modulan el metabolismo intermedio tanto a través de efectos directos como indirectos. Los primeros incluyen efectos directos sobre el metabolismo de carbohidratos, lipidos y proteinas. Aunque se ha visto que las acciones metabólicas directas de las catecolaminas son mediadas a través de mecanismos beta adrenergicos, los efectos hepáticos han sido cificiles de clasificar con certeza.

Los efectos metabólicos indirectos incluyen la modulación de la secreción de una gran diversidad de hormonas, entre las que se encuentran fundamentalmente las pancreáticas sobre las que actuan las catecolaminas inhibiendo la producción de insulina y activando la de glucagón. Se han probado tambien acciones mediadoras adrenérgicas en la liberación de somatostatina y en la de hormonas del eje hipotálamo-hipofisario.

Una descarga adrenérgica, produce un patrón de respuestas metabólicas que es la resultante tanto de los efectos directos como indirectos de las catecolaminas, que incluye un aumento en producción de glucosa hepática por aceleración de

las vías glucogenolíticas y gluconeogénicas y un descenso en el consumo de la misma por los tejidos sensibles a la insulina que dá como resultado,la aparición de hiperglucemia, así como un aumento en la liberación de acidos grasos y glicerol como resultado de un estímulo de la lipolisis en tejido adiposo que lleva a la potenciación de la cetogénesis y a la aparición de niveles elevados de cuerpos cetónicos en plasma.

La glucolisis muscular acelerada se asocia a la liberación de lactato y piruvato, que junto con el glicerol pueden ser empleados por el higado como sustratos gluconeogénicos,al mismo tiempo que los aminoácidos. No obstante la liberación de alanina y glutamina por la célula muscular esta inhibida tras la estimulación de los receptores beta adrenérgicos, esta acción de las catecolaminas se efectua por inhibición de los sistemas de transporte de la membrana.

III.2.2.4.- GLUCOCORTICOIDES.

Las acciones metabólicas fundamentales de los glucocorticoides, se centran en el aumento de la producción de glucosa estimulando la capacidad hepática para la gluconeogénesis y la disponibilidad de sustrato para la misma procedente de tejidos periféricos,

Los glucocorticoides aumentan la liberación de aminoácidos musculares por activación de la degradación protéica ó por inhibición de su síntesis, como Goldberg (34), ha demos-

trado al inhibir dicha síntesis por administración de cortisol a animales bien alimentados.

En humanos en ayunas Shaman (35), ha demostrado un aumento neto del 40 %, en la tasa plasmática de aminoácidos de cadena ramificada lo que es debido según este autor a la acción antiinsulínica de los glucocorticoides.

A largo plazo, en sujetos tratados con hormonas de este tipo y bien alimentados, el unico aminoácido que se mantiene elevado es la alanina (sustrato fundamental de la gluconeogénesis), hecho que podria ser interpretado como una activación de su síntesis a partir de otros aminoácidos.

III.2.2.5.- ESTEROIDES SEXUALES.

Evidencias clínicas y experimentales (36), apoyan la hipótesis de que las hormonas esteroideas gonadales son las responsables de la aceleración del desarrollo muscular que ocurre durante la pubertad. Ha sido demostrado, que estas hormonas estimulan al mismo tiempo que el citado desarrollo muscular, el aumento en la velocidad de captación de aminoácidos extracelulares y la incorporación tanto de los mismos como de los intracelulares (37) a la síntesis de nuevas proteinas.

Los aminoácidos esenciales, están en mayores concentraciones en el plasma después de la pubertad, y además los niveles de estos aminoácidos pueden ser relacionados con los de hormonas gonadales y con los de DHEA y DHEA-S que son sus principales precursores, asi mismo Bartelelt (38), ha demostrado una inhibición del catabolismo de los citados aminoácidos que es directamente relacionable con el aumento de dichas hormonas, igualmente Frieden (39) demostró hace tiempo un aumento de la incorporación de glicina a proteinas inducible por testosterona,aumento que fue relacionado por Kasesenaar (40) con el de RNA citoplasmático, resultados que fueron confirmados por Wilson (41).

Aunque en un principio se pensó que no existia ninguna relación definitiva entre hormonas gonadales y aminoácidos libres intracelulares ó plasmáticos en condiciones fisiológicas (42), se ha podido establecer (43) que los cambios inducidos por la aparición de la pubertad modifican sensiblemente los niveles de aminoácidos, que estos niveles se correlacionan estrechamente con los de DHEA y que los aminoácidos en los que ocurren los mayores incrementos relativos son los esenciales, datos confirmados por Ackerman (43), que encontró elevadas las concentraciones plasmáticas de aminoácidos de cadena ramificada tras la administración de testosterona a pacientes geriátricos. Christensen (44) demostró hace tiempo que el aumento de la velocidad de crecimiento de un tejido y el de la captación de aminoácidos por el mismo son hechos

que están estrechamente relacionados entre si.

III.2.2.6.- HORMONAS PANCREATICAS.

De las hormonas secretadas a la circulación por el páncreas, la insulina es el factor principal que controla el almacenamiento y metabolismo de nutrientes en fase postabsortiva, los efectos de esta hormona se efectuan sobre glúcidos, proteinas y grasas, y tienen lugar en hígado, músculo y tejido adiposo en cada uno de los cuales se observan efectos anabólicos y catabólicos que están muy relacionados entre si. Dados los objetivos de nuestro trabajo, centraremos nuestra revisión en los efectos de la insulina y de las restantes hormonas pancreáticas en el metabolismo protéico.

Esta ampliamente establecido que la insulia aumenta la captación muscular neta de la mayor parte de los aminoácidos como resultado tanto del estímulo de su transporte hacia el músculo y de la activación de la síntesis de proteinas como de la inhibición de su catabolismo (46), este efecto es particularmente notable entre los de cadena ramificada y los de estructura aromática. Así mismo se ha comprobado, que cuando se inyecta insulina acompañada de glucosa, se produce de forma inmediata una disminución de los niveles plasmáticos de alanina,(47) lo que se debe muy probablemente a una disminu-

ción en la liberación de dicho aminoácido por el músculo, ya que el consumo del mismo por el hígado, en las condiciones de experimentación, no aumenta de manera significativa.

De todo lo anteriormente relacionado puede deducirse que la insulina aumenta el anabolismo protéico por los siguientes mecanismos :

1) aumento de la captación de aminoácidos por los tejidos.
2) activación de la síntesis protéica
3) inhibición parcial del catabolismo de proteínas
4) inhibición de la oxidación de aminoácidos

Los efectos del incremeto de insulina y glucagón sobre los niveles de aminoácidos de cadena ramificada y de alanina en plasma, son sorprendentemente aditivos. El nivel de estos aminoácidos desciende mas y de forma más rápida si se incrementan las dos hormonas que si lo hace solo una de ellas. Se puede explicar la caida de ambos por un aumento en la velocidad de captación de los primeros y una disminución en la de la síntesis de la segunda secundaria a la inhibición de un catabolismo protéico inducidos por la insulina, que se sumarían al aumento en la captación de alanina por el hígado debido al glucagón,efecto este último ampliamente demostrado en cuanto a la activación de la gluconeogénesis a partir de glucosa (48), pero discutido en los aspectos que hacen referencia a la activación de la velocidad de captación de la alanina por el hígado (49)(50)

Observaciones clínicas, hacen pensar que el glucagón in-

terviene en el control de los niveles plasmáticos de aminoácidos ya que,en pacientes afectados de glucagonomas (51)(52) se encuentran disminuidos, mientras que dichos niveles estan elevados en pacientes pancreotectomizados tratados con insulina (53)(54). Boden (55),ha investigado los efectos del glucagón a concentraciones fisiológicas llegando a la conclusión de que un aumento del glucagón circulante inducía la elevación de los niveles de glicina, alanina, citrulina y lisina y no alteraba los niveles de los aminoácidos de cadena ramificada, dicho aumento se invertía al disminuir el glucagon, en estudios posteriores, este autor planteo la posibilidad de que, en condiciones fisiológicas, las acciones de la insulina y el glucagón estarian mediadas por la somatostatina (56)(57).

III.3.- FACTORES PATOLOGICOS QUE MODIFICAN EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS.

Si, de acuerdo con la teoria de Seyle, consideramos al stress como el conjunto de alteraciones que aparecen en el organismo al hallarse frente a una situación agresiva compleja de cualquier tipo,es evidente que en el conjunto de acciones no especificas que aparecen como respuesta,y que son fundamentalmente endocrino-metabólicas,jugaran un importante papel los aminoácidos, ya que estos compuestos juegan, como he-

mos visto en la revisión anterior, misiones fisiológicas fundamentales e intimamente relacionadas, tanto en sus aspectos catabólicos destinados a la producción de energía, como en los anabólicos orientados a la síntesis de nuevas biomoléculas.

En el presente capítulo revisaremos las principales alteraciones de los citados aminoácidos en estos tipos de situaciones, comenzando por estudiar las que se inducen en los niveles plasmáticos de los mismos, para a continuación tratar de las modificaciones de sus metabolismos tanto hepático como muscular y de las influencias hormonales de uno u otro tipo que en dichos metabolismos se instauran durante periodos de stress.

III.3.1.- NIVELES PLASMATICOS DE AMINOACIDOS EN EL STRESS

Las modificaciones en las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos que se producen durante el stress, están condicionadas tanto por la hidrólisis de proteinas que se establece, como por las alteraciones del metabolismo del exceso de aminoácidos que se liberan a la circulación. Shenkin (58), ha observado, que los aminoácidos plasmáticos se modifican profunda y selectivamente despues de un traumatismo, de forma que la suma de las concentraciones de los aminoácidos no esenciales se mantiene dentro de limites normales mientras que los aminoácidos esenciales y los de cadena ramificada se elevan de forma sensible, así como las relaciones entre algunos de ellos,extremo establecido por Witehead (59) en pacientes con historia clínica de malnutrición. Otros autores, (60) (61) han valorado las modificaciones del cociente phe/tir,como indicadoras de tipos de patologia similar.

Frecuentemente han sido citados niveles elevados de fenilalanina (62),en alteraciones metabólicas severas secundarias a sindromes infecciosos ó inflamatorios (63), lo que podria ser debido a liberación de este aminoácido desde la célula muscular hacia el plasma como respuesta a la acumulación intracelular del mismo.

Los comentarios anteriores apoyan la conclusión de que el balance negativo de nitrogeno que se produce en traumas se debe a un gran aumento del catabolismo de proteinas muscula-

res (64), lo que contrasta con los resultados de O'Keefe (65) que afirma que la perdida de masa muscular secundaria a traumatismo leve, se debe mas a una disminución en la síntesis de proteinas que al aumento de su catabolismo. No obstante, estos datos y los de Williamson (66), son dispares ya que este último autor encuentra un aumento en la excreción de nitrógeno y 3-metilhistidina interpretando dichos resultados como indices de aumento del catabolismo protéico.

En los estados metabólicos de perdida de proteina tisular debidos a causas tales como la inanición ó la diabetes, las concentraciones plasmáticas de aminoácidos de cadena ramificada se incrementan de manera selectiva, datos que unidos a las conocidas particularidades de su metabolismo muscular así como a los del papel regulador de la leucina en el mencionado metabolismo (67)(68), han sido utilizados como puntos de partida de estudios del desarrollo dotallado de estos hechos (69), lo que ha permitido a Smith (70) observar que la elevación de los niveles de aminoácidos de cadena ramificada en traumatismos severos se produce en las primeras 24 horas siguientes al trauma, y a otros autores (71) concluir que la elevación se produce de forma inmediata en sujetos gravemente traumatizados y que no habia cambios significativos de dichos niveles en pacientes con traumatismos leves, de estos y de otros hechos se ha deducido (72) que las elevaciones de los niveles plasmáticos de los aminoácidos de cadena ramifi-

cada estan relacionados con factores tales como la edad,sexo, estado nutricional, asi como de la gravedad de la lesión y de la coexistencia de inmovilización e infecciones en el paciente.

Aditi (73), ha estudiado los cambios que se producen en las concentraciones de aminoácidos plasmáticos durante estados de inanición y ha podido establecer que los cambios mas evidentes ocurren en los primeros días después de comenzar el ayuno. Este autor ha observado como ya desde el primer dia, aumenta la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada del gamma amino butírico y de la HGH y disminuyen los de alanina e insulina, alcanzandose los valores maximos y minimos respectivos a las 48 h,y tendiendose, a partir de ese momento, a estabilizarse primero y a normalizarse después dichos niveles, si bien esto último no sucede completamente hasta después de abandonarse el periodo de ayuno. Otros aminoácidos como taurina, serina, glutamina,asparragina, glutámico, citrulina, tirosina y fenilalanina, no se alteraron por la manipulación dietética.

Los mecanismos bioquimicos,de los que los datos citados son el principal resultado han sido ampliamente estudiados, (73)(74)(75), habiendose concluido que la elevación de los aminoácidos de cadena ramificada en el ayuno es debida a:

1) Incremento de la producción.

2) Alteraciones de los mecanismos de transporte.

3) Utilización alterada

La conclusión de que los aminoácidos de cadena ramificada elevados durante el stress inducido por el ayuno proceden exclusivamente del músculo, fue ampliamente cuestionada hace algunos años (76)(77)(78)(79)(80) con pruebas obtenidas en experiencias basadas en el empleo de métodos de organo aislado, no obstante parece ser un hecho claro que los niveles de aminoácidos de cadena ramificada procedentes del higado, no se incrementan en el humano sometido a ayuno (81)(82), aunque dicho organo si podria modificar su velocidad de liberación por el músculo (83) (84)(85).

III.3.2.- METABOLISMO HEPATICO Y MUSCULAR DE AMINOACIDOS EN EL STRESS.

En el stress existe un aumento de la velocidad con que se desarrollan los procesos catabólicos y anabólicos. El catabolismo, predominante de manera global, va a afectar a las proteinas del organismo con un cierto orden dependiente de la tasa de turnover de las mismas. Asi, las proteinas plasmáticas de corta vida media,son las primeras que se ven arectadas lo que es en parte responsable de las hipoproteinemias y disproteinemias que aparecen tras las lesiones graves ya de modo precoz. Las proteinas musculares, aunque son de lento turnover, al suponer mas del 40% de las proteinas corporales, son las que mas colaboran a la pérdida nitrogenada.

Existen, no obstante, factores ambientales que pueden modificar estos tipos de respuesta al stress, así el catabolismo protéico es menos intenso en la mujer premenopausica,en el anciano y en el desnutrido. El citado catabolismo es también menor si se mantiene al paciente en hipotermia ó si esta sometido a nutrición parenteral.

Sea cual sea el mecanismo intimo de la activación del catabolismo protéico, el resultado neto del mismo es el aumento tanto de la cesión de aminoácidos por parte del musculo a la circulación como de la captación de los mismos por el hígado donde siguen vias degradativas que confluyen en metabolitos intermediarios tipo piruvato,que pueden a su vez seguir vias catabólicas de producción de energía ó anabólicas de distintos tipos predominando en el hígado las gluconeogénicas sobre todas las restantes.

A nivel muscular predominan los procesos catabólicos. Se ha demostrado una depresión por el stress de la síntesis de proteinas en el músculo que es máxima a los 3 ó 4 días del comienzo del proceso y que va acompañada de un aumento en la liberación de aminoácidos a la circulación que podria ser secundaria a la elevación de sus niveles intracitoplasmáticos elevación que potenciaria la inhibición de la síntesis protéica ya establecida. Se ha demostrado, que en estados de este tipo, el aminoácido que sale del músculo en mayor cantidad es la alanina,que llega masivamente al hígado. Este aminoácido es un activador directo del ciclo de la urea, lo que se ha

comprobado al observar en estos casos, un aumento de la actividad intracelular de algunos enzimas de dicho ciclo y de la eliminación de urea.

III.3.3.- INTERRELACIONES ENDOCRINO-METABOLICAS DEL STRESS.

Actualmente, esta aceptado, que cualquier agresión inespecífica sobre un organismo previamente sano va a provocar de forma independiente a su causa etiológica, una serie de alteraciones concomitantes, fundamentalmente cardiovasculares, metabolicas y endocrinas, que el organismo desarrolla inicialmente cayendo en un periodo de decaimiento que se caracteriza por una perdida brusca de la vitalidad orgánica. Posteriormente, el individuo de un modo todavia no explicado, pueda superar este estado entrando en un periodo de recuperación, en el que se ponen en marcha los mecanismos corporales de defensa.

Las principales caracteristicas de esta respuesta orgánica al stress, son:

a) Durante las horas inmediatas al mismo, el metabolismo energético está dominado por los mecanismos habituales de producción de energia, apareciendo un estado de pseudodiabetes que se caracteriza fundamentalmente, por el establecimiento de hiperglucemia debida a la escisión del glucógeno hepático, acompañada de hipoinsulinemia relativa y de intolerancia a la glucosa. Todos estos fenómenos, son debidos al exceso de adre-

nalina secretada, que estimula la glucogenolisis e inhibe la entrada a la célula de glucosa,por inhibición de la insulina. Está inhibida también la oxidación de los ácidos grasos.

b) En las horas siguientes, el consumo de glucosa por los tejidos junto con su agotamiento de los depósitos hepáticos dará como consecuencia un descenso relativo y progresivo de la glucemia, acompañado de una elevación de la insulinemia y de intolerancia a la glucosa, lo que sugiere un mecanismo de insulinorresistencia de origen no totalmente aclarado

El desarrollo posterior de la respuesta, va a tener como objetivo principal evitar el caos metabólico,tendiendo el organismo a activar mecanismos que permitan un aporte adecuado de oxigeno y sustratos energéticos a los organos vitales. Esta continuación de la respuesta, que puede considerarse como un periodo de recuperación es de duración variable y dependiente de la gravedad del trauma y se caracteriza por un incremento del catabolismo proteico que condiciona una excreción aumentada de nitrógeno y un balance negativo para el mismo;se establece tambien un aumento del catabolismo energético a expensas sobre todo de grasa endógena y de aminoácidos y una caracteristica tendencia a la retención de agua y sodio y a la eliminación de potasio.

Si el organismo consigue superar la fase anteriormente descrita, en la que predominan las acciones catabólicas,se instaurará una recuperación de la vitalidad orgánica reapari-

ciendo los procesos anabólicos que se manifiestan principalmente por una tendencia a la positivación del balance nitrogenado y al comienzo de la restauración de los depósitos proteicos.

Los aspectos endocrinológicos de la respuesta metabólica al stress son complejos. Pueden encontrarse en él, alteraciones hormonales que aceleran el catabolismo y otras que dan como resultado final una potenciación de las vías anabólicas.

El grado de modificación de algunas etapas del metabolismo energético y la potencia relativa de las hormonas que lo regulan,determina las caracteristicas de la respuesta final que se induce.

Según Flear (86), el factor desencadenante de las alteraciones metabólicas que se inducen por el stress, es la falta de acción de la insulina a nivel celular, esta impediría el normal funcionamiento de la bomba de sodio y favorecería la salida de aminoácidos por alteraciones de la permeabilidad de membrana e inhibiría la piruvatokinasa intracitoplasmática a consecuencia de lo cual se veria inhibida la glucolisis y se favorecería el catabolismo protéico.

Apoya estas razones, el hecho establecido hace tiempo, de la hiperglucemia que se instaura en el stress. En general, en estos casos se producen alteraciones del metabolismo en las que se potencian tanto la glucogenolisis como la neoglucogénesis, encontrándose acompañada la hiperglucemia de

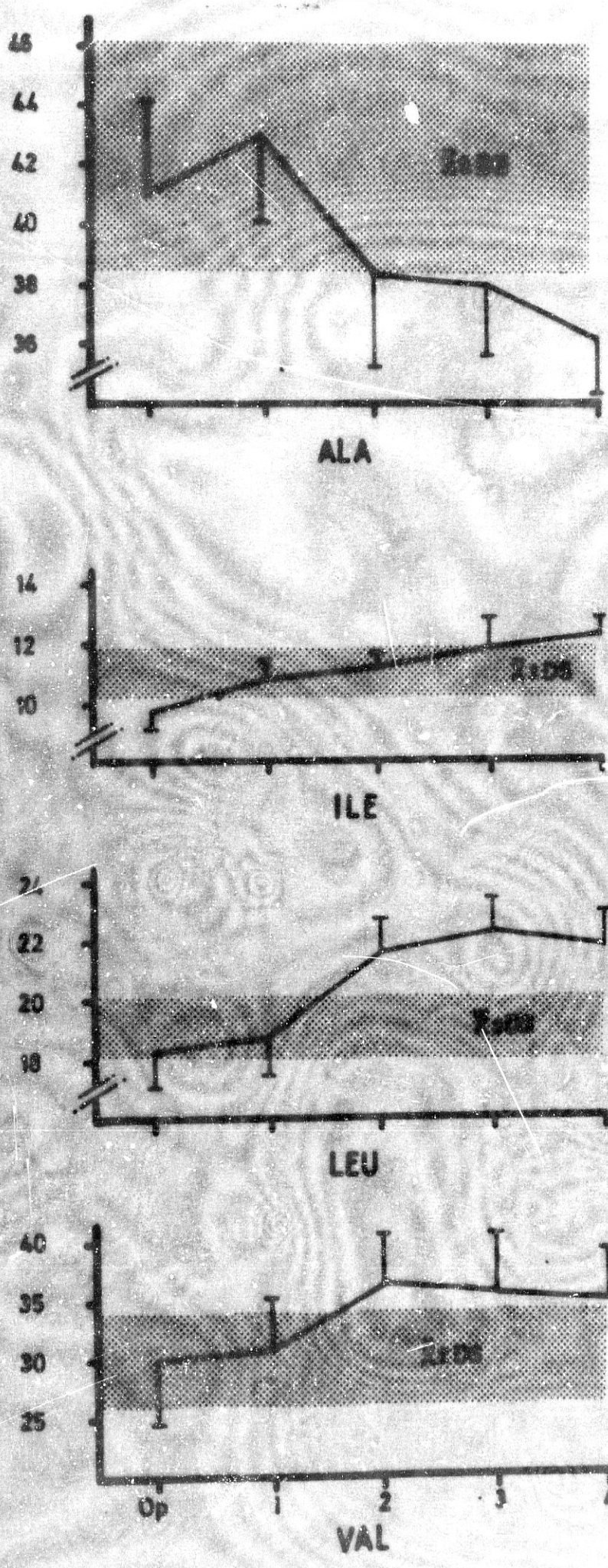
hiperinsulinemia y de intolerancia a la sobrecarga de glucosa (87). En este tipo de respuesta, que es de caracter totalmente inespecifico (66), la disminución inicial de la respuesta insulínica, está, probablemente mediatizada por un aumento de catecolaminas ya que se ha observado (89),una supresión de la secreción de insulina en pacientes perfundidos intravenosamente con glucosa y adrenalina,por lo que se admite para estos casos un hipoinsulinismo relativo. No obstante otros antagonistas de la insulina como son el glucagón,la HGH, ACTH y principalmente el cortisol, estan presentes en la sangre a elevadas concentraciones durante el stress, y está ampliamente demostrado que median la respuesta al mismo, sobre todo en los aspectos que se refieren a los efectos de esta última hormona,cuya presencia es indispensable para que el organismo pueda reaccionar ante cualquier tipo de agresión física ó siquica (90), jugando un papel fundamental de tipo "permisivo" en los cambios metabólicos postraumáticos (91), así,se ha observado que tras la cirugia, aumenta considerablemente el nivel de cortisol plasmático, este nivel puede tardar en normalizarse, hasta 15 días. En traumatismos graves, los aumentos pueden ser mas duraderos y correlacionarse bien con la gravedad del traumatismo (92). En ambos casos, la elevación en la cortisolemia, provoca aumentos de su fracción libre que son debidos a múltiples causas, entre las que se encuentran además del aumento de la secreción, el alargamiento de su vida media, la saturación de las proteinas de transporte, la

disminución de su eliminación renal, etc.

Aunque, como se ha citado (92), existe cierta relación entre los niveles de cortisol plasmático y la gravedad de un traumatismo,un factor de gran interés en la respuesta al mismo puede ser la presencia, simultánea y mantenida, de tasas muy elevadas de ACTH en plasma, esta hormona, comienza a secretarse masivamente en el momento del traumatismo, llegando a ser sus niveles muy superiores a los requeridos para el desarrollo de la respuesta corticosuprarrenal; sin embargo, parece ser que en el stress, la secreción de cortisol esta mediada por los aumentos precoces de secreción de ACTH, por lo que, en estos casos, coexisten en sangre niveles elevados de cortisol y ACTH de forma simultánea y de duración variable y dependiente del tipo y/ó gravedad del trauma.

En los traumas cráneo encefálicos, el mantenimiento de las tasas elevadas de ACTH, podría deberse al estimulo hipotalámico mantenido, ocasionado por la lesión, debido a lo que la elevación de estas hormonas sera mayor y se mantendrá durante más tiempo.

La desaparición en estados de stress, del mecanismo de feed-back que regula la secreción de cortisol, de su ritmo circadiano, han sido descritos en numerosas ocasiones como factores que influyen en sus niveles plasmáticos y por consiguiente en su intervención en la respuesta metabólica del organismo (93)(94)(95)(96)(97)(98)(99).


46
44
42
40
38
36
ALA
14
12
10
ILE
24
22
20
18
LEU
40
35
30
25
0p
1
2
3
4
VAL

GRAFICA 2

Se sabe bien que el consumo excesivo de proteinas por el organismo y una sintesis reducida de las mismas (100),son factores comunes en los pacientes bajo graves estados de stress (101,102). Si bien se sabe todavia muy poco de las causas que las originan (100) y de sus consecuencias, se supone que los aumentos en la degradación de proteinas satisfacen las necesidades de precursores de la gluconeogénesis hepática (103) y de las de energia, estas últimas por medio de la degradación de aminoácidos de cadena ramificada (104,105,106), ya que en el stress, los niveles de insulina plasmática se elevan (101,108), inhibiendose la lipolisis y con ella la principal fuente de energia que utilizan las vias gluconeogénicas normales (109)(110), ya que estas se conservan inalteradas captandose,por el higado, alanina,lactato y otros precursores (111). Solo cuando falla el higado, se acumulan estos sustratos y aparece la acidosis láctica (112).

La respuesta metabólica al stress, incluye la necesidad de proporcionar al organismo aminoácidos que garanticen un incremento de la sintesis de nuevas proteinas que permitan la aparición de procesos de defensa (113), tanto a través del aporte de precursores, como del suministro de sustratos de las vias catabólicas productoras de energia.

Según lo anteriormente revisado, la gran perdida de proteinas que sigue a las situaciones de stress, se caracteriza por el transporte de los aminoácidos almacenados en la musculatura hacia los tejidos viscerales, donde son empleados como

fuentes de energía, esta energía, es utilizada por las células para mantener una velocidad adecuada en algunas vías anabólicas indispensables para la vida.

III.3.4.- METABOLISMO DE AMINOACIDOS EN POLITRAUMATIZADOS.

La liberación de aminoácidos desde la musculatura periférica de pacientes politraumatizados sujetos a un fuerte stress metabólico plantea ciertas particularidades. Estudios publicados por Dolph (114), muestran incrementos en los niveles plasmáticos de los aminoácidos de cadena ramificada, que se corresponden con una hiperglucemia refractaria a la insulina y con un descenso de los niveles de alanina,estas variaciones han sido imputadas a los aumentos de su liberación periférica potenciada por glucocorticoides y al consumo hepático favorecido por el glucagón. La disminución del contenido plasmático de alanina reflejaría un agotamiento de las reservas periféricas movilizables. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Elia (115) quien observó similares comportamientos en los niveles de alanina en plasma tras administrar sobrecargas de leucina. Herdmon (116), ha encontrado en este tipo de pacientes, niveles de fenilalanina plasmática elevadas y ha demostrado que se encuentra elevada por un aumento de su producción y no por una disminución en su consumo hepático, al administrar sobrecargas de este aminoá-

cido y comprobar que aumentaba la proporción de tirosina de forma paralela, manteniéndose la eliminación urinaria de 3-metil-histidina en los niveles anteriores a la sobrecarga, lo que interpreta este autor como un índice del mantenimiento de la proteólisis muscular a lo largo de la misma. Gráfica 2.

III.4.- AMINOACIDOS TOTALES.FRACCIONAMIENTO DE AMINOACIDOS.

Uno de los primeros metodos que fue utilizado en la valoración de aminoácidos,fue el propuesto por Van-Slyke(117,118) basado en la liberación de nitrógeno al tratar grupos aminos primarios con nitritos;el nitrógeno liberado puede ser medido en condiciones adecuadas y relacionarlo con la concentración molar del compuesto amínico reaccionante.

Se han utilizado,así mismo,las sulfonas como reactivos para la determinación del N2 amínico en plasma y orina(119). Concretamente el naftoquinsulfato es capaz de formar,con grupos aminicos primarios,un complejo anaranjado valorable colorimétricamente. Este método, descrito ya en 1.943 por Framen, permite valorar nitrógeno amínico total,tanto en plasma como en orina, sin embargo,es necesario considerar la necesidad de eliminación previa del ión amonio presente en las muestras, pues presenta una fuerte interferencia.

Mas recientemente Goodwin(119,120) propuso una reacción entre compuestos con grupo amino primario y 1-fluor-2-4 dinitrobenceno, que produce un compuesto coloreado que sigue la ley de Beer y que presenta un máximo de absorción a 356 nm., este método ha sido puesto a punto para determinar aminoácidos en distintos tipos de muestras biológicas,habiendo sido propuesto como método patrón para su valoración ,en las citadas muestras(166).Un método parecido,basado en la misma reacción,fue propuesto por Sanger para identificación de grupos

amino-terminal,en la secuenciación de proteinas.

Una de las técnicas mas usadas en la determinación de ni
trógeno aminico,se basa en el empleo de la reacción de ninhi
drina,en la que los aminoácidos (grupo amino de los mismos
reaccionan con este compuesto dando hidridantina de color a
zul, que sigue la ley de Beer y es por tanto utilizable com
método colorimétrico.En la citada reacción se libera 1 mol d
CO2 por mol de aminoácido reaccionante,pudiendose utilizar e
resultado, de una eventual medida de volumen del carbónic
producidos, en la valoración de aminoácidos presentes en l
muestra (117).

Otros métodos de valoración de aminoácidos totales , em
pleando técnicas quimicas, han sido propuestas por Pope (1
que cuantifica aminoácidos por un método indirecto q
termina en una titulación iodométrica,y que ha sido modifica
do por diversos autores en este último aspecto de la val
ración del compuesto intermedio obtenido.Asi ha sido discuti
da la utilización de la fenantrolina,e incluso de métod
más sofisticados como puede ser la medida,por absorción at
mica,del aminoácido presente en el compuesto intermedio fo
mado.

Se han descrito, asi mismo,métodos basados en el empleo d
sales de cobalto,este ión(123)es capaz de reaccionar con ami
noácidos dando derivados medibles de una manera espectrof
siguiendo varios métodos.

FRACCIONAMIENTO DE AMINOACIDOS.

A medida que se han ido poniendo a punto nuevos métodos para la valoración de aminoácidos y comprobado su eficacia, han ido quedando en desúso los más clásicos. Así las técnicas de valoración de aminoácidos totales, han quedado casi totalmente desplazados por los que permiten la cuantificación y fraccionamiento de los mismos, entre ellos se encuentran tanto los que se basan en la utilización de reacciones químicas específicas, como los que lo hacen en el empleo de propiedades metabólicas ó físico-químicas de los mismos. A continuación revisaremos las que han sido ó son más usuales de entre todas ellas.

III.4.1.- METODOS QUIMICOS DE FRACCIONAMIENTO.

Estos métodos ,de un gran valor para el screening de aminoácidos,han sido puestos a punto de forma limitada a un corto número de aminoácidos,debido,fundamentalmente,a la necesidad de encontrar una reacción específica que permita seleccionar en una mezcla,el aminoácido deseado o bien alguno de sus metabolitos, obtener derivados y efectuar medidas de su concentración de forma directa o indirecta.

La primera técnica químita cualitativa específica de valoración de un aminoácido fue dada por él ya varias veces citado Folling ,que valoró el ácido fenilacético y fenilpirú-

vico en orina haciendole reaccionar con percloruro de hierro, reacción que produce un color verde azulado y que es relacionable con un aumento de fenilalánina sérica,no obstante este método solo tiene actualmente un interés histórico,ya que han sido puestos a punto varios métodos optativos que permiten la valoración cuantitativa del aminoácido o de sus metabólitos, como el de Underfriend (124) en el cual la reacción básica es la descarboxilación de la fenilalanina que produce feniletilamina,a su vez determinable mediante la reacción con anaranjado de metilo que produce una coloración que sigue la ley de Beer.

Un método enzimático ha sido descrito por La Nue(125)y Michael,que hacen actuar sobre el aminoácido una oxidasa específica,que convierte al mismo en su ceto-derivado,éste,en presencia de ión arsenato o borato produce un derivado enólico que posee un máximo de absorción en el ultravioleta 308 nn.

El método químico más usado en la valoración de la fenilalánina fue puesto a punto en 1.962 por Mc Caman(126), y consiste fundamentalmente en la producción de un derivado fluorescente, por reacción de dicho aminoácido con ninhidrina en presencia de cobre. A pesar de que la reacción citada se interfiere por varios dipeptidos e incluso presenta reacciones cruzadas con diversos aminoácidos y sustancias metabólicas, para su gran sensibilidad (solamente son precisos algunos

microlitros de muestra) y su reproductibilidad han hecho que se diseñen métodos de screening automatizados,basados en esta reacción (127,128),con los que se ha conseguido optimizar la reacción, evitando casi totalmente las interferencias.

La cistina es otro aminoácido para el que se han desarrollado métodos químicos específicos de valoración, métodos que pasan en todos los casos por la reducción de la cistina o cisteina,debiendose así mismo,determinar la cistina presente en la muestra a fin de poder calcular posteriormente el nivel de cisteina real analizado.

La reacción de la cisteina con nitroprusiato (reacción específica del grupo sulfidrilo) y la posterior reducción con cianuro,del derivado formado,es el método puesto a punto por Brown(129)en 1.977,como test simple para la determinación de cistinuria,este método ha sido posteriormente mejorado y utilizado,incluso en diversos tipos de determinaciones seriadas Cetest,Ketostit,etc.En algunos casos se han propuesto modificaciones que propunen la estabilización del pH del medio de la reacción,ya que el desarrollo óptimo de la misma se dá a un pH alcalino. Así,han sido publicados métodos en los que el pH se estabiliza con diversos tipos de tampones entre 7 y 8 ;en alguno de ellos se evita la manipulación del fuertemente tóxico ión cianuro utilizando como agente reductor el borohidrato sódico.

El test de Sullivan para análisis de cistina(130)publicado en 1.936 , continúa siendo utilizado,debido a que la reacción

de este aminoácido con naftoquinon sulfonato, seguida del tratamiento con ión cianuro, a pH alcalino e hiposulfito sódico, presenta escasas interferencias; no obstante, dan la primera fase de la reacción todos los aminoácidos conocidos.

Otras técnicas que se han empleado, ó continúan empleandose en la determinación de cistina, son las basadas en la reacción de la misma con acetato de plomo en medio alcalino y en caliente; con posterior determinación del grupo sulfuro libre, o la puesta a punto por Fernandez (131) en la que se obtiene un color intenso, al hacer reaccionar la cistina, previamente precipitada y reducida con clorobenzoquinona; la especificidad, linealidad y sensibilidad del método han hecho que sea utilizado como rutina en la cuantificación de este aminoácido en los casos en que la reacción de Rhosental (132), fundamentalmente cualitativa, no sea suficiente.

Algunas de las enfermedades metabólicas ligadas al aminoácido tirosina, fueron descritas ya por Garrod en 1.908 y desde mucho antes, se encuentran en la literatura pacientes en los que aparece sintomatología probablemente ligada a alteración del metabolismo de dicho aminoácido. Las valoraciones de tirosina se basaron en primer término, en las de sus metabolitos presentes en orina, en el caso de la alcaptonuria presentaban la característica de oscurecerse al contacto con el aire y la de presentar un poder reductor, distinguible del debido a la presencia de glucosa. Los métodos mas o menos actua-

les de valoración de tirosina,están basados en reacciones que dá este aminoácido,con nitroso naftol,produciendo una coloración roja inestable que puede ser estabilizada por eliminación del exceso de nitroso naftol por calentamiento en presencia de ácido nitrico (133),este tratamiento produce un compuesto amarillo que puede ser medido tambien fluorimetricamente(134). En algunas técnicas el compuesto se mide,previa extracción del mismo,con disolvente orgánico. Otros autores opinan que dicho paso no es necesario si se utiliza, para la eliminación del exceso de nitroso naftol,el ácido fosfórico.

La optimación de alguno de los métodos descritos ha permitido la puesta a punto de métodos para determinación de este aminoácido,que permiten partir de volúmenes muy pequeños e incluso de muestras de sangre recogidas por absorción en papel de filtro,del que posteriormente se extrae el aminoácido mediante ácido tricloro acético.La utilización de un método basado en la referida metódica,ha permitido la puesta a punto de procedimientos de screening rutinario,automatizados para este compuesto.

Otro aminoácido cuya determinación ha sido abordada por métodos químicos ha sido la hidroxiprolina que se encuentra en el colágeno en concentraciones significativamente elevadas con respecto a otras proteinas,debido a lo cual puede ser empleado como marcador de enfermedades de tejidos de los que forma parte mayoritariamente.En la valoración de este aminoácido hay que tener en cuenta que solo el 8% se encuentra en

estado libre ,y el resto,forma parte de pequeños péptidos,por lo tanto la primera medida previa a la determinación,será la de someter a hidrolisis a la muestra,con objeto de obtener el aminoácido de forma libre.Para la determinación de este aminoácido es necesario referirse de manera necesaria a técnicas cromatográficas que permiten purificarlo;no obstante la detección del aminoácido, posterior a su separación cromatográfica está basada en la formación de compuestos coloreados,mediante la oxidación del mismo con agua oxigenada o cloramina, tratamiento que produce ácidos derivados del núcleo pirrol.Otra sustancia que se ha empleado en la obtención de derivados coloreados de la hidroxiprolina ha sido el reactivo de Ehrlich (dimetilamino), que a veces ha sido empleado previamente a la extracción.

La utilización de ninhidrina o de isatina como reactivos detectores, es la base de los procedimientos cuantitativos (117) más empleados en la valoración de este aminoácido.

III.4.2.- METODOS MICROBIOLOGICOS.

El análisis de aminoácidos mediante técnicas basadas en el empleo de bacterias,han sido aplicadas por diversos autores; buscando tanto determinaciones cuantitativas como cualitativas.

Es clásico el método de análisis de cistina en presencia

de lisina y arginina que puso a punto Yeh (135),basado en el empleo de bacterias cuyo crecimiento era condicionado por el aminoácido que se determinaba.

Otros métodos de valoración basados en la inhibición del crecimiento de cultivos de bacterias,fueron puestos a punto por Guthrie(136) para leucina,tirosina,metionina,valina y fenilalanina;este último aminoácido,consiguio valorarlo mediante el empleo de una cepa seleccionada de bacilos subtilis para la cual,la fenilalanina se comporta como factor de crecimiento. La tecnica original de valoración del citado aminoácido ha sido empleada como test de screening para la oligofrenia fenilpiruvica,y es un método clásico entre los de este tipo.

En general,los métodos bacteriológicos que se describen en la bibliografía,parten de cultivos en medio sólido o líquido que carecen del aminoácido a valorar,o contienen un competidor metabólico del mismo;una vez añadido al medio de cultivo la muestra problema,bien en forma líquida,bien de disco impregnado (medios sólidos),ésta se puede valorar por medida de la turbidez del medio líquido (aumenta proporcionalmente a la concentración del aminoácido) o por medida del halo de crecimiento del microorganismo,alrededor del disco que contiene la muestra.Es obvio decir, que estas valoraciones se realizan comparando la medida problema con una curva construida con los resultados de las medidas de soluciones patrones de concentraciones diversas.

Estos métodos de estudio de niveles de aminoácidos han sido ampliamente revisados por Guirard (137),quien ha publicado amplias revisiones en las que cita,resultados propios o recogidos de otros autores referentes a medios de cultivo (sólido o liquido),composición de los mismos,tipo de germen a emplear ,concentraciones standar,tipo de medida a efectuar,etc.

III.4.3.- METODOS ELECTROFORETICOS.

La determinación de aminoácidos de forma simultanea previo fraccionamiento de los mismos,ha sido realizada empleando técnicas basadas en la emigración diferencial que sufre cualquier molécula eléctricamente cargada al someterla a la acción de un campo eléctrico (electroforesis).

Han sido propuestas en bibliografía muy diversas técnicas de este tipo en las que se usan diversos tampones (a pH diferente) (138) con el fin de conseguir el pK idóneo,en el cual los aminoácidos de una muestra se separen adecuadamente.Asi mismo ha sido propuesto el empleo de gran cantidad de soportes, que van desde el papel,a diversos tipos de geles (poliacrilamida, almidon, etc.), habiendose utilizado asi mismo con este objeto capas de silicagel,alumina o acetato de celulosa.

En cuanto a la propia separación eletroforética se han utilizado técnicas de bajo voltaje (139),con el inconveniente

de tiempos de análisis largos y problemas de la difusión en el soporte,o técnicas de alto voltaje (140) que requieren utillaje complejo, si bien aumenta la velocidad y eficacia de la separación.

Algunos autores han utilizado técnicas bidimensionales en las que se consiguen mayores resoluciones. En la misma línea se han propuesto técnicas mixtas electroforéticas que se basan en dobles desarrollos,empleando un método electroforético para el primero y cromatográfico para el segundo.Así mismo se ha descrito la influencia en la resolución de los ángulos relativos de la placa durante ambos desarrollos,estos ángulos pueden ser de cero grados (dos desarrollos en el mismo sentido) 180 grados (desarrollos en sentido opuesto),y 90 grados;este último método es el mas utilizado ya que produce unos óptimos resultados.

El método de valoración más empleado para los aminoácidos previamente separados es el densitométrico,previa tinción con ninhidrina de los mismos.

Otras técnicas de determinación,tales como la elución de bandas del soporte empleado,no son utilizadas en la determinación de aminoácidos.

A pesar de que las técnicas electroforéticas conocieron una época de auge en la decada de los años 50,con respecto a su utilización en la determinación de aminoácidos,y de otras técnicas tales como las cromatográficas,que ofrecen mayor versatibilidad,así como las dificultades que plantea la auto-

matización de las técnicas electroforéticas, han hecho que estas pierdan actualidad en este aspecto y que hoy día sean poco o nada utilizadas en el análisis de aminoácidos.

III.4.4.- METODOS CROMATOGRAFICOS.

A pesar de la muy amplia metodología que ha sido diseñada y utilizada para la medición de niveles de aminoácidos en muestras biológicas,han sido los métodos cromatográficos los que han impulsado este tipo de determinación hacia una solución definitiva,habiendo progresado en los últimos 20 años, de tal manera que en la actualidad es posible analizar los aminoácidos presentes en una muestra en tiempos inferiores a los 50 minutos, con coeficientes de variación menores del 10%.

III.4.4.1.- CROMATOGRAFIA DE PARTICION EN PAPEL.

Las primeras técnicas de este tipo desarrolladas para analizar aminoácidos,se basaron en diversos métodos de partición que utilizaron sistemas unidimensionales sobre papel,y proporcionan buenos resultados en algunos programas de screening de enfermedades metabólicas del recién nacido (141),fundamentalmente programados para encontrar patologías metabólicas ligadas a la fenilalanina.

Específicamente orientadas a la valoración de este aminoácido han sido descritas metodologías (142) que completan el análisis del mismo en periodos no superiores a las 2 horas y que estan basados en técnicas de partición en papel.

Mutodologias muy similares han sido descritas para detección de desordenes del metabolismo de la histidina en las que solamente varía el tipo de fase movil empleada (143).

Técnicas bidimensionales,que emplean papel como fase estacionaria (144),han sido utilizadas también en este tipo de análisis,consiguiendose de esta forma la separación de aproximadamente 30 bandas diferentes en el cromatograma final,obtenido a partir de suero desproteinizado.

III.4.4.2.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

La necesidad de aumentar la rapidez y sensibilidad proporcionada por las técnicas de partición, que utilizaron papel como soporte,hicieron a diversos autores poner a punto técnicas en las que se sustituyó aquel por otros tipos de soportes.

Técnicas unidimensionales,que emplean capas finas de celulosa(145) o silicagel(146),han sido utilizadas con buenos resultados en la solución de este problema.El empleo conjunto de capas finas de celulosa y fases moviles que contienen ciclohexilamina,proporcionan separaciones en tiempos extremada-

mente cortos. La utilización de técnicas bidimensionales han sido tambien citadas para valorar aminoácidos en orina y en suero,obteniéndose los mismos resultados suficientemente reproducibles como para ser empleados en screening de defectos metabólicos (141). Las técnicas de cromatografía citadas son fundamentalmente cualitativas,no obstante han sido realizadas modificaciones que permiten obtener resultados cuantitativos de las mismas(147); modificaciones que con pequeñas variantes están basadas en colorear los aminoácidos separados mediante una reacción específica (ninhidrina ninhidrunacadnió) y medir el color desintométricamente o la superficie (planimetría) de las manchas obtenidas (147).

III.4.4.3.- CROMATOGRAFIA DE GASES.

La cromatografía gas-líquido plantea ventajas cara a la resolución del problema planteado por el análisis de aminoácidos,derivadas de su gran sensibilidad y su alta velocidad de análisis,por lo que ha sido empleada (148,149) en algunas ocasiones, sobre todo en los aminoácidos que no dan reacción con la ninhidrina y no pueden ser detectados con técnicas de otro tipo.

Las ventajas citadas para este tipo de cromatografía se enfrentan con problemas que la hacen poco utilizables,debido, sobre todo a lo largo y complicado de la preparación previa a

que es preciso someter la muestra a fin de obtener mezclas semipurificadas,así como la necesaria preparación de diversos tipos de derivados que faciliten tanto la separación como la detección de los mismos.

III.4.4.4.- CROMATOGRAFIA DE CAMBIO IONICO.

Este método es el más extendido para el análisis de mezclas de aminoácidos en muestras biológicas,particularmente desde la semiautomatización del mismo,desarrollada por Moore en 1.954(107),habiendose obtenido mediante esta técnica la mayor parte de las tablas de valores normales que figuran en la bibliografía mundial.

Para obtener resoluciones reproducibles en la separación de aminoacidos por esta tecnica,se han creado programas de elución que utilizan una secuencia de tampones previamente preparados (151) o mediante la mezcla progresiva de dos de ellos,con lo que se obtiene un gradiente de elución.

Al mismo tiempo que se han desarrollado programas de análisis de aminoácidos totales,se han investigado protocolos que permiten análisis de tipo selectivo para ser empleados en screening de ciertas enfermedades metabólicas y que emplean columnas de separación mas cortas que consiguen, junto con programas de elución apropiados,acelerar la separación.

De esta forma varios autores (152,153,154) han publica

do métodos adecuados para determinar algunos aminoácidos,por ejemplo la fenilalanina,en periodos inferiores a 1 hora y coeficientes de variación del orden del 3%,que son tiempos notablemente inferiores a los normalmente utilizados (del orden de 8 horas).

Existen en este campo numerosas revisiones en las que se investiga la técnica,variando parámetros como por ejemplo,tipo de resina,siendo las resinas sulfonadas(155) las que consiguen óptimas separaciones.asi mismo se establece en estas revisiones la influecia en la separación del tamaño de las particulas de la resina utilizada,sistema de tampones empleados (156), y procedimiento de desproteinación y preparación de la muestra (157).

El empleo de técnicas de purificación de la muestra de forma previa a la determinación de aminoácidos y gran cantidad de compuestos metabólicos, utilizando resinas de cambio iónico empaquetadas en pequeñas columnas,es un método ampliamente empleado en la rutina de los laboratorios,ya que se pueden alcanzar aceptables grados de purificación en muy corto espacio de tiempo.

III.4.4.5.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC).

Si bien la cromatografía liquida de alta presión fue plan-

teada teóricamente a comienzos de siglo,solo durante la ultima decada ha sido desarrollada y convertida en tecnica utilizable analíticamente,permitiendo separar mezclas complejas y valorar por separado sus componentes.

El sistema de separación más ámpliamente usado en HPLC es el de fase reversa,que fue ya teoricamente planteado por Martin en 1950 , y que consiste fundamentalmente en el empleo de una fase estacionaria poco polar que es eluida mediante una fase movil de alta polaridad.

Si bien el analisis de sustancias no polares por HPLC es una tarea simple,si plantea graves problemas el estudio de sustancias polares o ionizables (entre ellas los aminoácidos) por lo que se han puesto a punto técnicas de extracción basadas en la formación de pares iónicos. Sin embargo,el mecanismo fisico-químico mediante el cual se retiene una sustancia ionizada por un sistema de par iónico de una columna cromatográfica no ha sido totalmente resuelto.

Diversos autores (158,159) han sugerido que en la cromatografía de fase reversa,el mecanismo principal incluya:la formación de pares iónicos en la fase movil,y el aumento en el tiempo de retención,que es debido a una acrecentada interacción hidrofóbica con la fase estacionaria.

Una via alternativa presentada por Knox (161) sugiere que la fase estacionaria estaría recubierta por el agente formador de par iónico y que actuaria frente a los iónes de carga opuesta por un mecanismo de cambio iónico.

El mecanismo real puede ser una mezcla de los dos mecanismos indicados y que en él influyan la naturaleza y concentración del formador del par iónico,el tipo y composición de la fase movil y la fase estacionaria empleada.

Las diferentes técnicas presentadas en la bibliografía y que se refieren al análisis de aminoácidos son comunes en cuanto al empleo de la fase estacionaria,que tiene en la mayoría de los casos,un radical de 18 C (1S2),químicamente ligado alrededor de particulas inertes (se han descrito los empleos de radicales octil y cianopropil con este propósito), si bien en principio eran de tipo irregular y de 10 a 30 n.de tamaño medio ;posteriormente evolucionaron hacia el empleo de partículas esféritas de 5 n. de diámetro en las que la superficie cubierta con fase estacionaria era máxima y se evitaban los inconvenientes de existencia de absorción residual de grupos silanol libres en particulas no totalmente recubiertas (debido a una forma irregular) que constituía (no de los principales inconvenientes de las anteriores matrices utilizadas.

El sistema de elución mas usado en la determinación de aminoácidos por HPLC,esté formado por mezclas de diversas proporciones de tampon fosfato y metanol o acetonitrilo,si bien la optimización de las técnicas de separación ha llevado a la adición a las fases móviles de pequeñas porciones de formadores de par iónico y que tienen la misión de formar una u-

nión intermedia entre la fase estacionaria,los componentes de la mezcla y la fase movil (160) con lo que se utiliza de alguna forma un sistema reverso de cambio iónico.

La optimización de sistemas de elución de columnas en fase reversa ha sido abordada por numerosos autores,habiendose publicado diversos estudios sobre el tema,siendo de señalar el de Meek (163), en el que se recoge un normograma gráfico que permite deducir la retención relativa para un compuesto deperdiendo de las proporciones de disolvente orgánico en la fase movil.Posteriormente Nurok (164) ha publicado un trabajo similar en el que se calcula la resolución para varias sustancias en función de la fase móvil empleada y del correspondiente formador de par iónico utilizado.

Trabajos similares permiten optimizar teóricamente una separación; se refieren,a una resolución de columna en función del % de fase orgánica en fase movil como constantes de disociación de diversos tampones en medios orgánicos y que han permitido construir gráficas orientativas de elección del sistema cromatográfico a emplear.

Diversos trabajos en los que se proponen métodos para análisis de aminoácidos siguiendo estas técnicas han sido recientemente publicados por diversos autores,planteandose en ellos diversas disyuntivas en cuanto a los sistemas de detección,encontrandose técnicas que utilizan la formación de derivados de todos los aminoácidos de forma previa a su separación (técnica precolumna) y otras que realizan dicha detec-

ción posteriormente a la separación.

Entre las técnicas precolumna,se utilizan reacciones específicas que permiten la formación de derivados tipo dansilo o feniltiohidantoina. Para los aminoácidos la dinámica de las reacciones respectivas,parece hacer muy aconsejable la obtención de derivados con optalaldeido en presencia de 2-mercaptoetanol, ya que la reacción es rapida y es estequiométrica , y los derivados obtenidos pueden ser separados en sistemas de fase reversa con gran selectividad y sensibilidad, por medida de la fluorescencia de los compuestos obtenidos.

IV.- MATERIAL

IV.1.- MUESTRAS CLINICAS.

Las determinaciones analíticas orientadas a la consecución de los objetivos de este trabajo, han sido efectuadas a partir de muestras obtenidas de los grupos de población que a continuación se describen.

IV.1.1.- ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE REFERENCIA.

Para el estudio de los valores referéncia de aminoácidos plasmáticos, hemos empleado muestras obtenidas de 60 voluntarios sanos de relación talla/peso equilibrada y alimentados con una dieta libre, tipica de la provincia de Granada, a los que hemos dividido en 6 grupos de 10 sujetos establecidos en función de su edad y de su sexo y recogidos en la tabla siguiente:

TABLA I

GRUPO	SEXO	EDAD	PESO	TALLA	S. CORP. MEDIA	OBSERVACIONES
I	V	2 - 8	10-30	105-135	1.00	prepuberales
II	M	2 - 8	9-29	96-130	0.99	prepuberales
III	V	15 - 50	65-95	165-180	1.95	adultos
IV	M	15 - 45	38-62	135-165	1.46	premenopausia
V	V	> 50	68-88	160-178	1.90	maduro
VI	M	> 45	45-65	145-160	1.49	postmenopausia

IV.1.1.1.- SUJETOS ESTIMULADOS CON ACTH.

Las muestras en las que hemos medido el efecto que sobre los niveles plasmáticos induce el estímulo agudo con ACTH,mediante el cual hemos simulado algunos de los aspectos endocrinos del stress físico, han sido obtenidas de 5 voluntarios sanos de edades comprendidas entre los 25 y 40 años a los que se administró de forma previa 0.25 mg de tetracosactido por vía endovenosa. Esta sustancia medicamentosa, análoga en su acción corticotropa a la ACTH, pero carente de la capacidad antigénica de la misma, nos ha sido proporcionada por la firma Ciba-Geigy, Basilea, Suiza.

IV.1.1.2.- INDIVIDUOS SOMETIDOS A STRESS FISICO.

La influencia del stress físico en los niveles de aminoácidos ha sido estudiado en muestras obtenidas de 20 sujetos sanos ingresados en el servicio regional de Neurocirugia de la C.S. Virgen de las Nieves a consecuencia de distintos tipos de traumatismo cráneoencefalico,en los cuales no era sospechable ninguna enfermedad endocrina previa. En la tabla siguiente figura la relación de los mismos acompañada de los datos correspondientes al sexo, edad y tipo de patología del paciente.

TABLA II

Paciente	Sexo	Edad	Exploración
01-MDFF	H	30	Contusión cerebral
02-FLM	V	41	Fractura occipital
03-SSN	V	56	Hematoma subdural
04-FMC	V	64	Contusión cerebral
05-RCE	V	53	Contusión cerebral
06-AFS	V	40	Fractura occipital
07-SBM	H	56	Fractura temporal
08-ADM	H	83	Fractura parietal
09-MGE	V	30	Contusión parietal
10-PUT	V	56	Fractura parietal
11-AMP	H	64	Contusión parietal
12-AEM	V	42	Fractura occipital
13-JGR	V	20	Hematoma epidural
14-FGP	V	18	Fractura temporal
15-CGJ	H	54	Fractura occipital
16-COC	H	81	Fractura parietal
17-ADD	V	18	Hematoma frontal
18-HEG	V	33	Fractura occipital
19-FMM	V	56	Hund. de frontal
20-DES	H	43	Fractura temporal

IV.2.- MATERIAL UTILIZADO EN EL ANALISIS DE AMINOACIDOS.

Los diversos aparatos y reactivos utilizados por nosotros durante el desarrollo de las experiencias realizadas a lo largo de este trabajo pueden agruparse, y en lo sucesivo nos referiremos a ellos como:

- Reactivos
- Material fungible
- Material inventariable

IV.2.1.- REACTIVOS.

Con esta denominación, nos referiremos a cualquier sustancia ó producto químico puro, bien como tal ó en cualquier tipo de solución, así como a mezclas que contengan varios de ellos.

IV.2.1.1.- SOLUCIONES DE REFERENCIA.

Como sustancias patrón para el calibrado y control de la respuesta del detector utilizado, se han empleado soluciones acuosas de los distintos aminoácidos estudiados. En la preparación de la empleada como estandar interno, se usó al ácido cistéico, que posee propiedades fisico-químicas similares y no se encuentra en las muestras biológicas analizadas.

IV.2.1.2.- FASES MOVILES.

Para la separación cromatográfica de los distintos aminoácidos hemos empleado como fase movil, mezclas de tampón acetico-acetato 0,05 M,(pH = 5,9), Metanol y Tetrahidrofurano. El acetato sodico utilizado en la preparación de los tampones así como el metanol y el tetrahidrofurano de calidad adecuada para HPLC, han sido proporcionados por la firma E.Merck (Darmstat,R.F.Alemana).

IV.2.1.3.- REACTIVOS DE DESPROTEINIZACION.

En la eliminación de proteínas de las muestras biológicas analizadas, hemos utilizado acido sulfosalicilico y CLH proporcionados por la firma E. Merck Darmstat R.F.Alemana. Para el ajuste del pH hemos empleado una solución 1.6 M de NaOH.El producto puro fue obtenido de la firma anteriormente citada.

IV.2.1.4.- REACTIVOS DE DETECCION.

El O-ptalaldehido, sustancia utilizada en la detección de aminoácidos con los que reacciona dando derivados fluorescentes, ha sido proporcionado por la marca Scharlau (FIOSA) Barcelona. El 2-mercaptoetanol y el dodecil sulfato sódico utilizados como coadyuvantes de las citadas reacciones de de-

rivación, fueron obtenidos de Sigma Chem.Co. St Louis USA.

IV.2.1.5.- ANALISIS HORMONALES.

En la medición de los niveles de hormonas en las muestras estudiadas, hemos empleado conjuntos de reactivos (kits) suministrados por la firma C.E.A.

IV.2.2.- MATERIAL FUNGIBLE.

Aparte del pequeño material de uso normal en los laboratorios (pipetas, puntas desechables, tubos de ensayo, etc), hemos empleado en la eliminación de partículas mayores de 40 micras de los tampones y reactivos utilizados, un sistema de filtración a vacío Millipore. Para el filtrado de soluciones hemos empleado filtros tipo FH4P04700 ó HAWP04700 según se tratara de purificar soluciones orgánicas ó acuosas.

IV.2.3.- MATERIAL INVENTARIABLE.

Nos referiremos en este apartado a los aparatos empleados en la separación y análisis de aminoácidos, así como a aquellos que se han usado en cualquier tipo de cuantificación durante este trabajo.

IV.2.3.1.- CROMATOGRAFO LIQUIDO-LIQUIDO.

Hemos utilizado un cromatógrafo Beckman 342 formado por un modulo programador de gradientes Altex 420 que actúa regulando el funcionamiento de dos bombas dosificadoras Altex 112, capaces de mantener flujos de fase movil comprendidos entre 0.01 y 10 ml/min a través de una columna cromatográfica Beckman Ultrasphere ODS RP-18 de 250x4 mm, cuya fase estacionaria está formada por radicales de un hidrocarburo saturado de 18 atomos de Carbono ligados químicamente a los grupos silano libres de una matriz formada por microesferas de anhidrido silícico de 5 micras de diametro medio.

El sistema formado por el programador y las bombas dosificadoras, está acoplado a la columna cromatográfica a través de una valvula de inyección Beckman 210 con "loop" de 20 ul.

Los componentes de las muestras problema han sido detectados a la salida de la columna mediante un fluorímetro Gilson Spectra-Glo, provisto de filtros de interferencia (excitacion: 360 nm; emision: 455 nm) que realiza la medición en una cubeta de flujo continuo de 15 microlitros de capacidad. Las mediciones efectuadas en el detector citado, han sido registradas, y cuantificadas por comparación con las correspondientes al estandar interno en un integrador Shimadzu-Chromatopac C-R1B.

IV.2.3.2.- MEDIDA DE VOLUMENES.

Las introducciones de muestra en el sistema cromatográfico descrito,se han realizado a través de su válvula de inyección mediante una microjeringa Hamilton microliter 702 de 25 microlitros de capacidad, obtenida de la firma Hamilton microliter Bonadur. A.G ,Bonadur,Switzerland.

IV.2.3.3.- MEDIDAS DE RADIACTIVIDAD.

Las medidas de intensidad de radiación gamma, paso final de los métodos radioinmunológicos que hemos utilizado para la valoración de las tasas de cortisol plasmático, así como el procesamiento de los datos obtenidos (medidos en cpm), se han realizado en un contador minigamma LKB, modelo 1275, dotado de un programa informático de tratamiento de datos.

V.-METODOS.

V.1.- METODO GENERAL DE ESTUDIO.

Hemos tratado de establecer la influencia del stress en los niveles de aminoácidos en plasma, mediante los siguientes pasos

1.-Estudio de los niveles normales de aminoácidos en distintos grupos de población normal de la provincia de Granada, previa puesta a punto de un método de análisis de los mismos de precisión establecida por medida de su C.V. %. Los aminoácidos estudiados han sido:

ASP: A.Aspartico;	ARG: Arginina;	VAL: Valina
GLU: A.Glutámico;	ALA: Alanina ;	PHE: fenilalanina
ASN: Asparragina;	TIR: Tirosina;	ILE: Isoleucina
SER: Serina ;	TRP: Triptófano;	LEU: Leucina
GLN: Glutamina ;	MET: Metionina ;	LIS: Lisina
THR: Treonina ;		

A los mismos nos referiremos en adelante citando sus abreviaturas internacionales.

2.- Simulación de algunos aspectos endocrinos del estress mediante la administración de ACTH I.V. a un grupo de voluntarios representativo de la población y establecimiento de las alteraciones en los niveles de aminoácidos del mencionado grupo atribuibles al tratamiento aplicado. Con el fin de contrastar la existencia y la magnitud del estimulo, hemos medido paralelamente el cortisol de las muestras en estudio.

3.- Estudio de las alteraciones en los niveles de aminoácidos inducidos por el stress físico en pacientes hospitalizados a causa de traumatismos craneoencefálicos, con respecto a los sujetos estudiados en los apartados 1 y 2.

Los métodos de preparación y conservación de los reactivos utilizados, medida de la precisión de la técnica empleada en el análisis de los aminoácidos, así como los utilizados en la selección de pacientes, obtención de muestras, etc., se describen a continuación.

V.2.- PREPARACION DE REACTIVOS.

Dado que, a nuestro juicio, estaría fuera de lugar la descripción detallada de los métodos generales utilizados en la preparación y estandarización de reactivos, relacionamos a continuación las composiciones ponderales de los utilizados en nuestro trabajo.

V.2.1.- TAMPONES.

Tampón Acético-Acetato 0,5 M pH : 5,9

Acetato sódico	41,0 g.
Agua destilada (calidad HPLC)	1,0 l.

Ajustar a pH : 5,9 con Acido acético glacial. Para usar en HPLC, diluir al 1:10 con agua destilada de dicha calidad.

Tampón Borato 0,4 M pH.: 9,5

Acido bórico	6,18 g
Agua destilada	250,0 ml

Ajustar el pH a 9,5 con hidróxido sódico en lentejas.

V.2.2.- REACTIVOS DE TRABAJO.

V.2.2.1.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Desproteinización

Acido sulfosalicílico	4,0 g
Agua destilada calidad HPLC	100,0 ml
Acido clorhídrico 37 %	1,0 ml

Ajuste de pH

Hidróxido sódico (lentejas)	6,4 g
Agua destilada calidad HPLC	100,0 ml

Estandar interno

Acido cisteico	0,2 g
Agua destilada calidad HPLC	100,0 ml

V.2.2.2.- SEPARACION DE AMINOACIDOS.

Fase movil A.

Tampón Acetato 0,05 M, pH :5,9 ..	808,0 ml
Metanol calidad HPLC	190,0 ml
Tetrahidrofurano calidad HPLC ..	2,5 ml

Mezclar, eliminar por filtrado partículas mayores de 40 micras, desgasificar (15 minutos en baño ultrasónico), utilizar a pH : 6,1

Fase movil B.

Tampón Acetato 0,05 M, pH :5,9 ..	200,0 ml
Metanol calidad HPLC	800,0 ml

Mezclar, eliminar por filtrado partículas mayores de 40 micras, desgasificar (15 minutos en baño ultrasónico), utilizar a pH < 7,0

V.2.2.3.- DETECCION.

OPA

O-ptalaldehido	0,05 g
Metanol calidad HPLC	1,20 ml
disolver por agitación suave	
Tampón Borato 0,4 M pH.: 9,5	11,00 ml
2 - mercaptoetanol	0,05 ml

Conservar, en oscuridad, entre 2 - 8 °C.

SDS

Dodecil sulfato sódico	2,0 g
Tampón borato 0,4 M pH.: 9,5	100,0 ml

Conservar en oscuridad a temperatura ambiente.

V.3 .- MEDIDA DE LA PRECISION.

Ha sido efectuada por establecimiento de los coeficientes de variación (desviación estandar expresada en %), tanto intraensayo (mismas condiciones de trabajo), como interensayos (precisión de reproducción de condiciones teóricas de trabajo), de los resultados obtenidos en 5 determinaciones de

las concentraciones de los distintos aminoácidos contenidos en las soluciones patrón a las que se ha hecho referencia en el apartado IV.2.2.1.

V.4.- SELECCION DE PACIENTES.

Los sujetos normales objeto de nuestro estudio han sido seleccionados según los criterios siguientes; no haber padecido enfermedad infectocontagiosa en los tres últimos meses; no padecer enfermedad renal, hepática ni metabólica; no estar sometido a ningún tipo de tratamiento; no haber padecido en los tres últimos meses problemas digestivos,como por ejemplo,gastritis, enteritis,duodenitis etc.

En el caso de las hembras también se tuvo en cuenta que no estuvieran en estado de gestación. Se rechazaron las que hubieran dado a luz tres meses antes de efectuar la obtención de la muestra y las que estuvieran bajo tratamiento anticonceptivo u hormonal de algún tipo.

Los voluntarios eran mantenidos en ayuno desde las 22 horas de la noche anterior a la recogida de la muestra,efectuandose la obtención de dicha muestra entre las 8.30 y 9.30 horas de la mañana. Posibles interferencias de las variaciones diurnas en los niveles de los aminoácidos eran eliminadas o reducidas al mínimo con este procedimiento en el mismo periodo de tiempo.

PREPARACION DE MUESTRA

A) Muestra problema

0'5 ml muestra + 0'025 ml St (Ac. cisteico 0'2%) + 0'5 ml SSA

Agitar 10", centrifugar (15 – 1500 g)

Separar 0'5 ml. sobrenadante

Neutralizar con Na OH 1'6 M hasta desaparición de turbidez)

DERIVAR

0'025 ml. de muestra

0'025 ml. de SDS 2%

0'050 ml. de OPA

mantener 1 mn. a 37°C

Inyectar en columna de HPLC.....0'010 ml.

o-ptaladehido 0'05 g

metanol HPLC 1'2 ml.

tampón borato 0'4 M 11 ml.

2-mercaptoetanol 0'05 ml.

Agitar 10"

0'5 ml muestra + 0'025 ml St (Ac. cisteico 0'2%) + 0'5 ml agua destilada

B) Muestra patron

Tuvimos en cuenta a la hora de obtener las muestras los aspectos siguientes :

1) Posible ingesta de alimentos no controlada antes de realizar la obtención de la muestra.
2) Actividad física antes de la prueba.
3) Influencia ó no del brazo en el que realizamos la extracción de la muestra.
4) Menstruación o etapa del ciclo menstrual en el que se encuentre la paciente.

La posible ingesta de comida antes de la obtención de la muestra fue resuelta,por nosotros,utilizando los criterios de Marvin y col., (1973)(165) ,según el cual niveles altos de metionina, valina, isoleucina, leucina,fenilalanina y lisina, eran indicadores de que los individuos habían comido.Nosotros eliminabamos a estos individuos del estudio.

El ejercicio físico es un factor que afecta de diversas formas a los niveles de aminoácidos en plasma,por lo que a los sujetos en estudio se les recomendaba no realizar ejercicios violentos durante 24 horas antes de la prueba.

Se ha comprobado que,en sujetos normales,la influencia de la masa muscular de un brazo u otro no es apreciable como para tenerla en cuenta a la hora de la obtención de la muestra.

Las muestra estudiadas procedentes de mujeres en edad fértil se han obtenido en el 5 día del ciclo,con el fin de evitar las posibles alteraciones debidas a cada fase del ciclo.

V.5.- OBTENCION DE MUESTRAS.

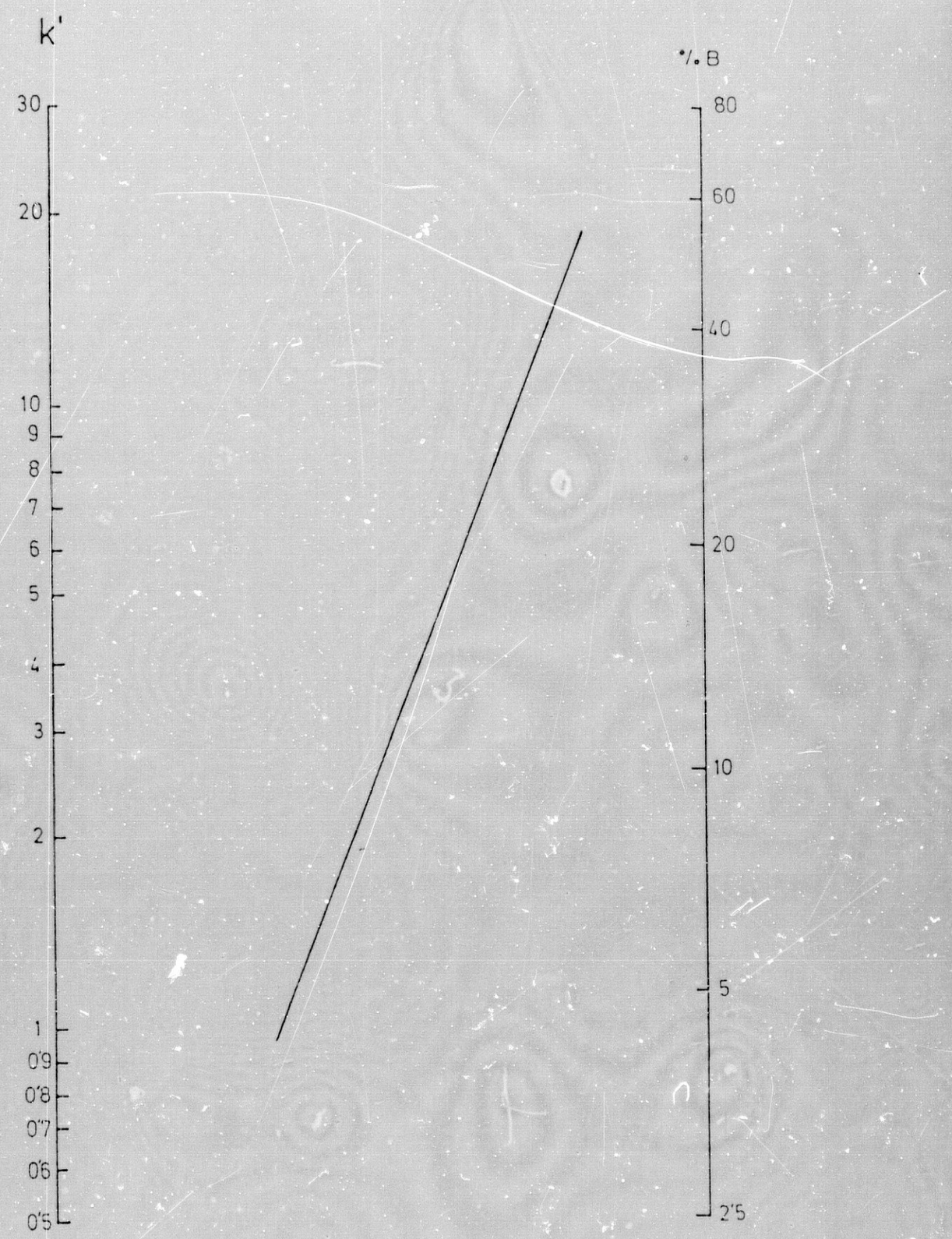
Las muestras de sangre que hemos empleado en nuestro estudio han sido obtenidas por punción venosa,de los sujetos seleccionados como se describe en el apartado anterior.

A los sujetos sometidos a stress físico por TCE se les extrajeron 10ml de sangre inmediatamente después de su reanimación y a las 24h,48h,72h, 5 día y septimo día después de la misma.El test de estimulo con ACTH se efectuo obteniendo 10ml de sangre previamente y a los 30',60',90'y 120' de la administración I.V. de 0.25 mgr de tetracosactido (Synacthen).

Estas muestras han sido recogidas en todos los casos,sobre 1 mgr de EDTA/ml e inmediatamente centrifugados a 4 grados centigrados con objeto de separar de las mismas,aproximadamente 4 ml de plasma, que ha sido separado en alicuotas de 1 ml y congelado inmediatamente y hasta el momento de su uso a -40 grados C.

V.6.- ANALISIS DE AMINOACIDOS.

La medida de los aminoácidos de las muestras ha sido realizada previo fraccionamiento de las mismas en el cromatógrafo descrito en el apartado IV.2.3 i., siguiendo la metodología que describimos a continuación desglosada en apartados referentes a preparación de muestra, separación de aminoáci-



% DE METANOL EN FASE MOVIL

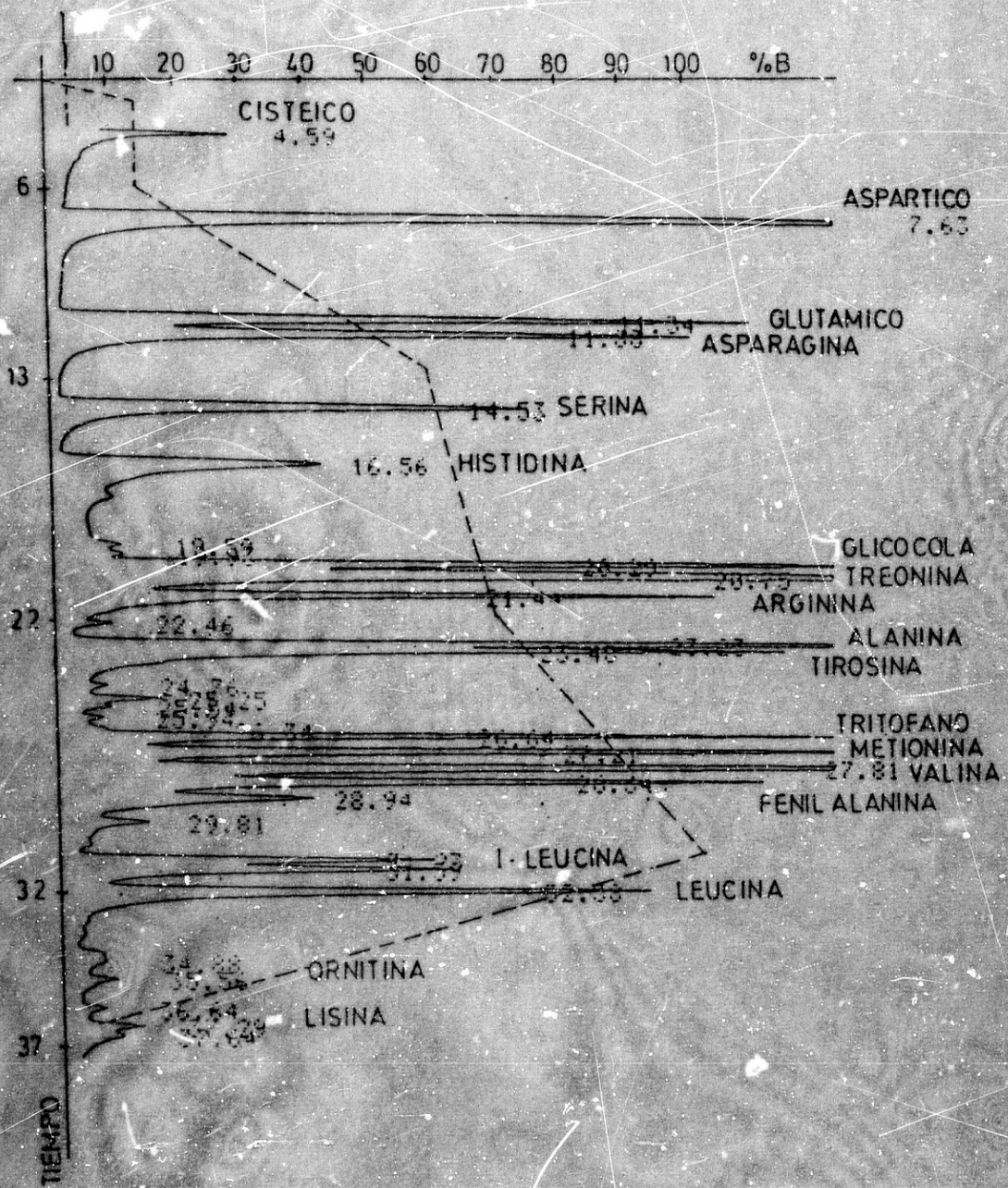
dos y detección y cuantificación de los mismos.

V.6.1.- PREPARACION DE LA MUESTRA.

Las muestras biológicas objeto del analisis han sido procesadas según el método que a continuación paso a paso se detalla.

Mezclar 0.5 ml de suero libre de hemolisis con 0.025 ml de solución al 0.2% de ácido cisteico (50 ug de producto puro por 0.5 ml de suero) Agitar brevemente y añadir a la mezcla 0.5 ml de solución de ac. sulfosalisílico, al 4%,en ácido clorhidrico al 1%,agitar 10 seg. y centrifugar inmediatamente la mezcla durante 15 minutos a 2000 revoluciones. Una vez separado el sobrenadante, neutralizar 0.5 ml del mismo con 0,07 ml de hidróxido sódico. Las soluciones patrón han sido tratadas de igual forma. Como es lógico en el procesamiento de las soluciones patrón, no se han efectuado los pasos de centrifugación. Con el fin de obtener derivados fluorescentes de los aminoácidos y facilitar su detección adicionar a 0.025 ml de muestra preparada segun se ha descrito, 0.025 ml de solución al 2% de duodecil sulfato sódico (SDS) y 0.05 ml de reactivo OPA-mercaptoetanol,agitar suavemente y mantener un minuto en la oscuridad a 37 grados centigrados. Inyectar 10 microlitros de la misma en la columna del cromatógrafo a través de la valvula de inyección. Un procedimiento adecuado, asequible y poco complicado para realizar la incubacion co-

CROMATOGRAMA PATRON



tada consiste en abrazar completamente con la mano el tubo en el que se desarrolla la reacción durante su transcurso.

V 6.2.- SEPARACION DE AMINOACIDOS.

Se ha efectuado eluyendo la columna con el sistema de fases moviles (A y B), formado por tampon Acetato, Metanol y un 0.25% de tetrahidrofurano, cuya composición detallada está recogida en el apartado V 2.2

Las proporciones de metanol en la mezcla,necesarias para optimar la separación se han ajustado mediante el normograma de Meek, que permite ajustar la eficacia de una columna en función de la proporción de Metanol que contenga la fase movil,(figura IV). El uso de este normograma parte de la medición de la eficacia de una columna cromatográfica para separar una determinada sustancia de otra que eluya muy próxima a ella, conocido este dato, se une el punto de la escala correspondiente a su valor, con el de la concentración de Metanol en la fase móvil a partir de la cual se ha establecido el mencionado dato.Las modificaciones necesarias de la citada concentración a fin de lograr la mejor resolución de una determinada sustancia, se consiguen haciendo girar la linea con la que se han unido las escalas verticales alrededor del punto de corte con la linea inclinada, obteniendose de esta manera la modificación de los valores de eficacia de resolución

(R) de la columna problema en función de la concentración del disolvente orgánico empleado. A continuación recogemos un método matemático de cálculo de la resolución de una determinada columna, lo cual puede conseguirse mediante la ecuación:

$$R = (V1 - V2)/W2$$

en la que sus distintos términos se interpretan así:

R: resolución de una columna para 2 sustancias (en cm/ml)

V2: volumen de retención del pico de mayor tiempo de retención (se calcula multiplicando el flujo (expresado en ml/min.) por el tiempo de retención.

V1: volumen de retención del pico de menor tiempo de retención.

W2: anchura en la base del pico de tiempo de retención mayor.

Las proporciones de Metanol en la fase movil se han modificado a lo largo del análisis mediante el programa de ajuste de las bombas de elución que recogemos a continuación:

TABLA III

Tiempo (minutos)	0	1	6	13	23	32	42	47
Función regulada	% B	% B	% B	% B	% B	% B	% B	END
Hasta Valor (ml/min)	1	14	14	60	70	99	1	-
Duración (minutos)	1	5	7	10	9	10	5	-

V.6.3.- DETECCION.

En la detección de los aminoácidos hemos empleado un método que consiste en la obtención de derivados fluorescentes de los aminoácidos de forma previa a su separación, y cuya metodología se describe en el apartado correspondiente a preparación de la muestra.

Los derivados de los aminoácidos han sido obtenidos por reacción entre un aldehido aromático (O-phtalaldehido), un tioalcohol (2-mercaptoetanol) y los grupos aminos primarios de los mismos.

Esta reacción que se da en condiciones óptimas y estequiométricas, en 1 minuto aproximadamente, a pH 10 , y 37 grados centígrados, produce un derivado capaz de emitir radiación a 420 nm si previamente se excita a 350 nm; la hemos preferido a otras similares por las condiciones de estabilidad del complejo formado,así como por las características estequiométricas de la reacción.

Los derivados obtenidos han sido introducidos en la columna cromatográfica y la fluorescencia de los mismos, una vez fraccionados, medida de forma continua a su salida. La señal obtenida en el detector, ha sido registrada y valorada según describimos a continuación.

V.6.4.- VALORACION.

La valoración de los aminoácidos separados ha sido realizada por comparación de las áreas correspondientes a cada uno de los picos del gráfico correspondiente al registro de las señales medidas por el detector con el del estandar interno empleado. Este método de valoración incluye la necesidad de corrección de la respuesta del detector para cada uno de los diferentes componentes medidos en la muestra, lo que se efectua multiplicando sus areas por los factores de respuesta correspondientes. Estos factores de respuesta se miden por trazado de la gráfica concentración vs. area de cada aminoácido y determinación de su pendiente, que no es otra que el resultado del cociente:

$$K = \text{concentración/area}$$

igualdad que se cumple mientras que la respuesta del detector sea lineal, extremo que se establece por cálculo del coeficiente de correlación de la citada gráfica concentración-respuesta. En el presente trabajo hemos empleado este tipo de metódica para el establecimiento de la sensibilidad, esta se ha definido como el punto de corte en el eje de ordenadas de la gráfica correspondiente.

V.7.- ANALISIS DE CORTISOL.

Se ha efectuado por un método radioinmunológico basado en la competición entre el cortisol marcado,el contenido en standar o muestras y un antisuero fijado a la pared del tubo en el que se efectuó el ensayo. Después de la incubación la cantidad de cortisol marcado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de cortisol (no marcado) presente en la muestra. Los ensayos se han realizado por duplicado como es habitual en este tipo de técnicas y las mediciones obtenidas han sido analizadas mediante ordenador por un método matemático de ajuste de curvas (Spline).

V.8.- METODOS ESTADISTICOS.

Los resultados obtenidos en las experiencias realizadas han sido analizados mediante uno ó varios de los siguientes test estadisticos que nos han permitido establecer la validez de los mismos.

1) Test "t" de Student, utilizado en la comparación de valores medios,obtenidos a partir de poblaciones formadas por muestras dependientes (datos obtenidos de los mismos sujetos en diferentes tiempos).

2) Los test ANOVA II (modelo de efectos fijos)y Tukey, se han empleado para la comparación entre si, de todas las

medias poblacionales por parejas, cuando se han rechazado las hipótesis de partida de esta técnica, según los test de Kolmogorov para la hipótesis de normalidad y el de Barlett para la hipótesis de igualdad de las varianzas poblacionales de las muestras,es decir,tras el establecimiento previo de diferencias entre dos poblaciones normales.

(Lopez-Lachero y col.,)(166);(Rios y col ,)(167);(Ruiz-Maya y col.,)(168);(Tejedor y col.,)(169).

VI.- RESULTADOS.

La expresión de los resultados obtenidos a lo largo de nuestro trabajo, será realizada comenzando por los referentes a la definición de las características del método de análisis empleado, base en la que nos apoyaremos para establecer los valores de referencia de los aminoácidos plasmáticos que serán tabulados a continuación, precediendo a los que miden las alteraciones de dichos niveles producidas por administración de ACTH i.v. y a los que reflejan las modificaciones de los mismos en pacientes con patologías inductoras de stress de cualquier tipo.

Pasamos a continuación a relacionar los datos que hacen referencia a la validez del método utilizado.

VI.1.- CARACTERISTICAS DEL METODO EMPLEADO.

En las tablas IV y V recogemos los datos referentes a la linealidad, sensibilidad y precisión del método empleado en la determinación de aminoácidos, expresada la primera de ellas como el coeficiente de correlación del gráfico concentración-respuesta construido utilizando soluciones patrón, de aminoácidos de 1.5, 1.0 y 0.5 mM, la segunda como la mínima cantidad de aminoácido problema (expresado en mg/l) que es posible detectar por el método de valoración utilizado y la tercera como el coeficiente de variación de los resultados de medidas seriadas de aminoácidos en suero humano y en soluciones patrón de concentración 1 mM.

TABLA IV

PRECISION DEL METODO

	Solucion patrón 1.0 mM		Suero humano
A.a	C.V. Intraensayo	C.V. Interensayos	C.V. Interensayos
ASP	4,5	5,5	8,5
GLU	11,8	17,0	18,3
ASN	12,0	15,5	19,7
SER	12,0	18,0	21,4
GLN	10,5	15,9	16,3
THR	3,1	16,0	16,4
ARG	4,0	18,5	19,2
ALA	7,2	19,5	21,5
TIR	10,7	17,8	16,4
TRP	9,8	17,6	20,9
MET	8,7	11,0	17,9
VAL	6,9	14,1	16,1
PHE	2,5	6,4	17,5
ILE	5,6	10,9	23,2
LEU	8,0	17,5	20,5
LIS	17,0	18,7	24,0

Los coeficientes de variación en % recogidos en esta tabla, expresan el cuadrado de la desviacion standard de cinco mediciones consecutivas de cada muestra.

TABLA V

LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD DEL METODO.

Intensidad de señal

para las concentraciones

A.a	1.5 mM	1.0 mM	0.5 mM	r	sensibilidad
ASP	349841	265259	157027	0.97	1.0 x 10^-5
GLU	266950	204675	127877	0.91	4.3 x 10^-4
ASN	208692	156018	90873	0.94	1.8 x 10^-1
SER	262380	198944	117770	0.98	5.4 x 10^-4
GLN	602830	462508	284420	0.96	2.8 x 10^-4
THR	596141	455647	262588	0.97	2.0 x 10^-5
ARG	502359	385424	237002	0.98	6.0 x 10^-4
ALA	552551	423751	244207	0.99	2.4 x 10^-5
TIR	181526	139179	86950	0.99	1.0 x 10^-3
TRP	398811	298150	173658	0.97	4.0 x 10^-1
MET	259235	224174	132987	0.97	2.0 x 10^-1
VAL	414330	311249	173240	0.99	3.0 x 10^-4
PHE	554583	410721	247318	0.97	4.0 x 10^-4
ILE	447578	331886	189727	0.97	5.0 x 10^-2
LEU	451120	336836	190347	0.96	2.7 x 10^-4
LIS	46532	20337	15857	0.92	1.0 x 10^-2

Coeficientes de correlación entre la cinco medidas de las soluciones cuyas concentración se citan en el encabezamiento.La sensibilidad está expresada como el punto de corte del eje de abcisas con la recta correpondiente.

VI.2.- VALORES DE REFERENCIA DE AMINOACIDOS.

Los resultados obtenidos con los métodos discutidos en el apartado correspondiente, se exponen a continuación agrupados en el siguiente orden:

Grupo I: Varones prepuberales. (Tabla VI)

Grupo II: Mujeres prepuberales. (Tabla VII)

Grupo III: Adultos menores de 45 años. (Tabla VIII)

Grupo IV: Mujeres premenopausicas. (Tabla IX)

Grupo V: Varones mayores de 45 años. (Tabla X)

Grupo VI: Mujeres postmenopausicas. (Tabla XI)

Todos los datos citados, estan expresados en mg/l. Cada uno de los mencionados grupos está formado por los resultados de las medidas de 10 muestras. El margen aceptado para el intervalo de confianza es de 2,5 D.E. y comprende al 95 % de la población considerada. Los resultados figuran expresados numerica y gráficamente de forma paralela, en las tablas reseñadas y en las graficas 1(1) y 1(2).

TABLA VI

Grupo I: AMINOACIDOS PLASMATICOS EN VARONES PREPUBERALES.

A.a	casos estudiados	media	D.E.	Intervalo
ASP	10	0.76	0.16	0.56 - 0.96
GLU	10	6.00	1.84	4.61 - 7.39
ASN	10	6.27	1.83	4.88 - 7.65
SER	10	12.59	2.50	10.70 - 14.48
GLN	10	87.04	6.24	82.32 - 102.06
THR	10	16.85	2.62	14.87 - 19.33
ARG	10	19.42	2.48	17.55 - 20.25
ALA	10	31.59	4.17	28.40 - 34.73
TIR	10	12.37	2.42	10.54 - 14.20
TRP	10	11.48	1.86	10.07 - 12.88
MET	10	4.15	0.64	3.66 - 4.64
VAL	10	27.52	4.20	24.35 - 30.69
PHE	10	9.81	1.67	8.54 - 11.06
ILE	10	8.71	2.14	7.09 - 10.32
LEU	10	17.53	3.38	14.98 - 20.89
LIS	10	31.49	4.21	28.31 - 34.67

Concentración de aminoácidos plasmáticos expresadas en mg/l medidos en 10 varones prepuberales. El intérvalo ha sido determinado mediante el método de cálculo recogido en el apartado de Material y Métodos.

TABLA VII

Grupo II: AMINOACIDOS PLASMATICOS EN MUJERES PREPUBERALES.

A.a.	casos estudiados	media	D.E.	Intervalo
ASP	10	0.71	0.28	0.49 - 0.92
GLU	10	5.63	1.59	4.43 - 6.84
ASN	10	5.71	1.65	4.46 - 6.95
SER	10	15.64	2.48	13.77 - 17.51
GLN	10	79.46	9.10	72.55 - 86.37
THR	10	17.47	2.19	15.81 - 19.13
ARG	10	14.72	2.90	12.53 - 16.91
ALA	10	30.06	4.22	26.88 - 33.24
TIR	10	8.75	1.68	7.48 - 10.02
TRH	10	9.34	1.74	8.03 - 10.66
MET	10	2.03	0.42	1.71 - 2.34
VAL	10	26.39	2.48	24.52 - 28.26
PHE	10	9.66	1.60	8.44 - 10.87
ILE	10	9.37	1.68	8.11 - 10.64
LEU	10	17.33	3.18	14.93 - 19.74
LIS	10	34.75	2.97	32.51 - 36.99

Concentración de aminoácidos plasmáticos expresadas en mg/l medidos en 10 mujeres prepuberales. El intérvalo ha sido determinado mediante el método de cálculo recogido en el apartado de Material y Métodos.

TABLA VIII

Grupo III: AMINOACIDOS PLASMATICOS EN ADULTOS POSTPUBERALES.

A.a.	casos estudiados	media	D.E.	Intervalo
ASP	10	0.75	1.89	0.58 - 0.82
GLU	10	8.67	1.89	7.24 - 10.10
ASN	10	6.45	1.72	5.15 - 7.75
SER	10	11.68	2.43	10.04 - 13.72
GLN	10	94.47	10.07	86.87 - 102.06
THR	10	17.73	2.12	16.12 - 19.33
ARG	10	18.37	2.50	16.48 - 20.25
ALA	10	37.47	4.96	33.73 - 41.21
TIR	10	13.01	2.73	10.95 - 15.07
TRP	10	12.35	2.55	10.42 - 14.28
MET	10	4.73	0.35	4.46 - 4.99
VAL	10	29.77	4.21	26.59 - 32.94
PHE	10	10.66	2.52	8.76 - 12.56
ILE	10	11.66	2.92	9.47 - 13.89
LEU	10	21.43	4.17	18.29 - 24.58
LIS	10	36.19	5.11	33.02 - 39.29

Concentración de aminoácidos plasmáticos expresadas en mg/l medidos en 10 adultos postpuberales. El intérvalo ha sido determinado mediante el método de cálculo recogido en el apartado de Material y Métodos.

TABLA IX

Grupo IV: AMINOACIDOS PLASMATICOS EN MUJERES PREMENOPAUSICAS.

A.a.	casos estudiados	media	D.E.	Intervalo
ASP	10	0.76	0.33	0.51 - 1.01
GLU	10	6.72	1.79	5.37 - 8.08
ASN	10	6.20	1.75	4.87 - 7.52
SER	10	13.34	2.44	11.50 - 15.19
GLN	10	84.80	7.67	79.02 - 90.59
THR	10	18.47	2.39	16.66 - 20.27
ARG	10	15.50	2.44	13.65 - 17.34
ALA	10	34.53	5.57	30.32 - 38.73
TIR	10	11.39	2.48	9.52 - 13.26
TRP	10	10.51	2.22	8.83 - 12.18
MET	10	4.02	0.84	3.38 - 4.65
VAL	10	25.22	2.46	23.36 - 27.08
PHE	10	9.37	2.45	7.52 - 11.23
ILE	10	9.12	1.59	7.84 - 10.40
LEU	10	15.82	2.84	13.68 - 17.97
LIS	10	31.84	3.97	28.84 - 34.83

Concentracion de aminoácidos plasmáticos expresadas en mg/l, medidos en 10 mujeres premenopáusicas. El intérvalo ha sido determinado mediante el método de cálculo recogido en el apartado de Material y Métodos.

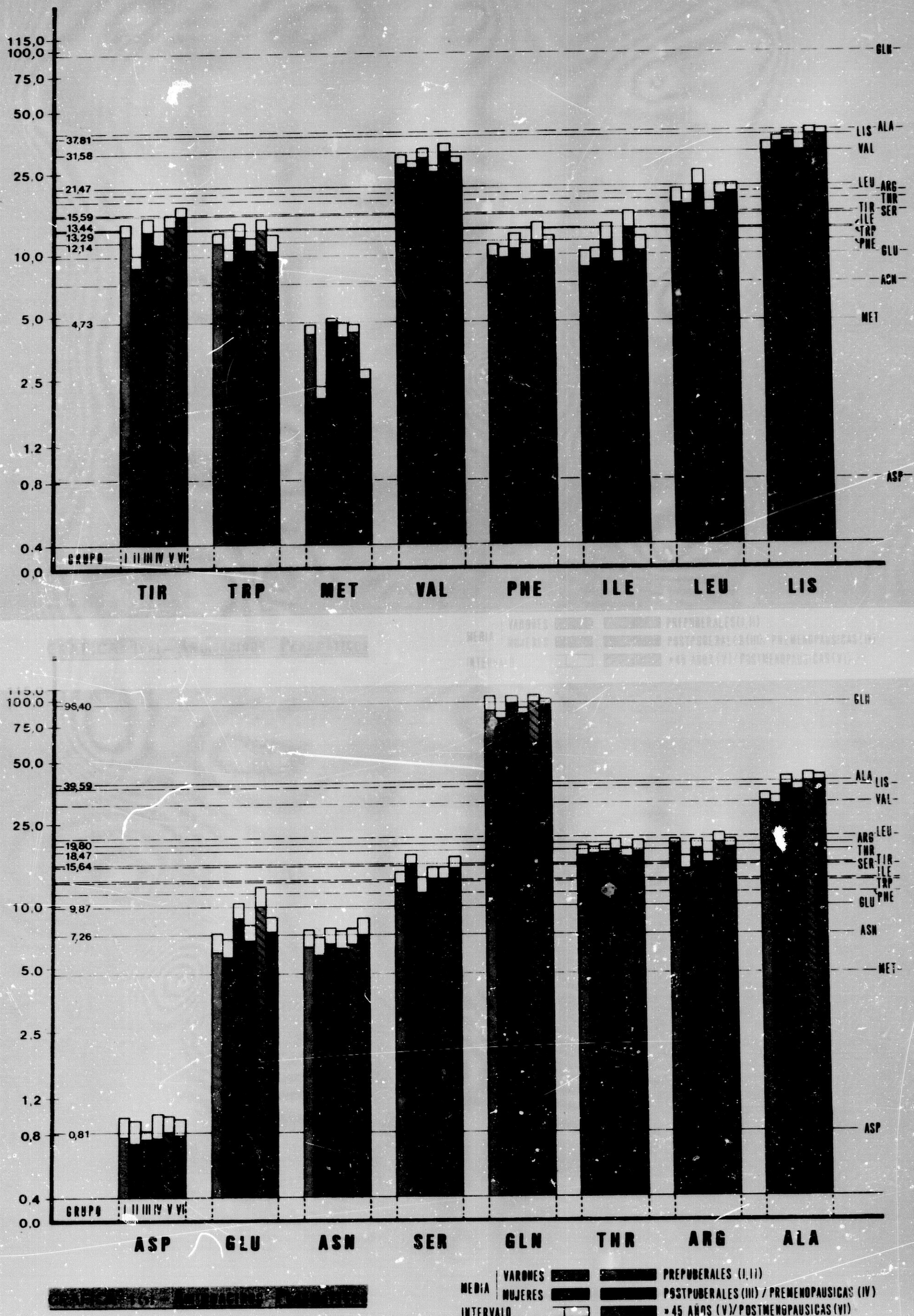

115,0
100,0
75,0
50,0
37,81
31,58
25,0
21,47
15,59
13,44
13,29
12,14
10,0
5,0
4,73
2,5
1,2
0,8
0,4
0,0
GRUPO I II III IV V VI
GLN
LIS
ALA
VAL
LEU
ARG
THR
TIR
SER
ILE
TRP
PHE
GLU
ACN
MET
ASP
TIR
TRP
MET
VAL
PHE
ILE
LEU
LIS
96,40
39,59
19,80
18,47
15,64
9,87
7,26
0,81
ASP
GLU
ASN
SER
GLN
THR
ARG
ALA
MEDIA
VARONES
MUJERES
INTERVALO
PREPUBERALES (I,II)
POSTPUBERALES (III) / PREMENOPAUSICAS (IV)
>45 AÑOS (V)/POSTMENOPAUSICAS (VI)

TABLA X

Grupo V: AMINOACIDOS PLASMATICOS EN VARONES DE MAS DE 45 AÑOS

A.a.	casos estudiados	media	D.E.	Intervalo
ASP	10	0.81	0.24	0.62 - 0.99
GLU	10	9.87	3.49	7.23 - 12.51
ASN	10	6.38	1.74	5.06 - 7.69
SER	10	13.33	2.46	11.47 - 15.19
GLN	10	96.40	7.85	90.47 - 102.33
THR	10	16.74	2.78	14.64 - 18.84
ARG	10	19.80	3.09	17.47 - 22.13
ALA	10	39.31	4.70	35.76 - 42.86
TIR	10	13.69	2.52	11.79 - 15.60
TRP	10	13.29	2.86	11.50 - 15.07
MET	10	4.22	0.54	3.81 - 4.63
VAL	10	31.58	4.20	28.41 - 34.74
PHE	10	12.14	2.74	10.07 - 14.21
ILE	10	13.44	3.29	10.95 - 15.92
LEU	10	19.69	3.13	17.33 - 22.05
LIS	10	37.81	4.18	34.65 - 40.96

Concentración de aminoácidos plasmáticos expresadas en mg/l, medidos en 10 varones de mas de 45 años. El intervalo ha sido determinado mediante el método de cálculo recogido en el apartado de Material y Métodos.

TABLA XI

Grupo VI: AMINOACIDOS PLASMATICOS EN MUJERES POSTMENOPAUSICAS

A.a.	casos estudiados	media	D.E.	Intervalo
ASP	10	0.77	0.22	0.59 - 0.94
GLU	10	7.49	1.72	6.19 - 8.79
ASN	10	7.26	1.78	5.91 - 8.61
SER	10	15.05	2.76	12.96 - 17.13
GLN	10	92.31	8.66	85.77 - 98.84
THR	10	17.91	2.96	15.67 - 20.15
ARG	10	18.49	2.44	16.64 - 20.34
ALA	10	39.59	4.04	36.54 - 42.64
TIR	10	15.56	2.28	13.88 - 17.24
TRP	10	10.35	2.82	8.22 - 12.48
MET	10	2.52	0.49	2.20 - 2.84
VAL	10	27.41	3.33	24.90 - 29.92
PHE	10	10.39	2.47	8.53 - 12.25
ILE	10	10.40	2.43	8.56 - 12.23
LEU	10	19.77	2.97	17.52 - 22.02
LIS	10	37.51	4.05	34.45 - 40.57

Concentracion de aminoácidos plasmáticos expresadas en mg/l, medidos en 10 mujeres postmenopáusicas. El intervalo ha sido establecido mediante el método de cálculo recogido en el apartado de Material y Métodos.

VI.3.- RELACIONES ENTRE LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

Una vez establecidos los ámbitos de normalidad para los aminoácidos estudiados por la técnica descrita en el apartado VI.2 en los grupos de población citados, hemos comparado entre si dichos grupos, para establecer las posibles diferencias que entre ellos pudieran encontrarse así como las causas a que pueden atribuirse.

Hemos empleado para dicho fin los métodos estadísticos descritos en el apartado V.8 en la comparación de los distintos grupos hemos seguido el orden general siguiente:

1) Relaciones entre niveles de aminoácidos medidos en grupos de diferente edad e igual sexo con el peso, talla, edad y superficie corporal de los individuos que forman parte de los mencionados grupos. Estas relaciones vienen dadas por la significación estadística de los coeficientes de correlación así como por sus respectivos signos (tablas XII y XIII) y por los resultados de los cocientes entre los valores medios de cada aminoácido, tabla XIV. En la grafica (3) se recoge la significación estadística ($p \leq 0,(01$) de las relaciones entre niveles de aminoácidos medidos en hombres y mujeres.

2: Diferencias entre los aminoácidos de todos los grupos entre si, expresadas como la significación estadística del test "t de Student", ver apartado VI.3.2 , tabla XV y XVI y graficas (4,5,6)

3: Establecimiento de las influencias de la edad, el sexo y de la interrelacion entre ambos,en las variaciones observadas en los grupos anteriores consideradas conjuntamente, ver apartado VI.3.3, tablas XVII y XVIII.

VI.3.1.- RELACIONES ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS DE DIFERENTES GRUPOS DE POBLACION.

En las tablas XII, XIII, XIV recogemos los coeficientes de correlación entre los niveles medios de aminoácidos medidos en grupos de población de diferente edad.La edad,peso,talla y superficie corporal de los mismos se encuentran recogidos en la tabla (I) pagina 60 . El limite de significación para los coeficientes de correlación(r) que presentamos es (P=95 %), r=0.80. En la gráfica (3) recogemos las relaciones entre todos los aminoácidos entre si, medidos en grupos de - hombres y mujeres. En las gráficas (4,5 y 6) presentamos gráficamente estas relaciones entre los aminoácidos ordenados en grupos de aminoácidos esenciales de cadena lineal, esenciales de cadena ramificada y no esenciales.

GRAFICA 3

COMPARACION DE LA EVOLUCION DE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS

HOMBRES

	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	THR	ARG	ALA	TIR	TRP	MET	VAL	PHE	ILE	LEU	LIS
ASP		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
GLU	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
ASN	-	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SER	-	-	-		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
GLN	***	***	***	-		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
THR	-	-	-	***	-		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
ARG	-	***	***	-	***	-		***	***	***	***	***	***	***	***	***
ALA	***	***	***	-	***	-	***		***	***	***	***	***	***	***	***
TIR	***	***	***	-	***	-	***	***		***	***	***	***	***	***	***
TRP	***	***	-	-	-	-	-	-	-		***	***	***	***	***	***
MET	-	-	-	***	-	***	-	-	-	-		***	***	***	***	***
VAL	-	-	-	-	-	***	-	-	-	-	-		***	***	***	***
PHE	-	-	-	-	-	-	***	-	-	-	-	-		***	***	***
ILE	-	-	***	-	-	-	***	-	-	-	-	-	-		***	***
LEU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		***
LIS	-	-	-	-	-	***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

MUJERES

TABLA XII

RELACIONES ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS

GRUPOS DE EDAD: HOMBRES.

	grupos			coeficientes de correlación			
A.a.	I	II	III	r (e)	r (p)	r (t)	r (S.c)
ASP	0.76	0.75	0.81	0.68	0.33	0.23	0.31
GLU	6.00	8.67	9.87	0.99	0.94	0.90	0.94
ASN	6.27	6.45	6.38	0.71	0.93	0.96	0.94
SER	12.59	11.88	13.83	0.38	- 0.02	- 0.07	- 0.03
GLN	87.04	94.47	96.40	0.99	0.97	0.95	0.97
THR	16.85	17.73	16.74	0.03	0.44	0.52	0.45
ARG	19.42	18.37	19.80	0.11	- 0.28	- 0.38	- 0.30
ALA	31.59	37.47	39.31	0.96	0.97	0.94	0.96
TIR	12.37	13.01	13.69	0.99	0.83	0.81	0.83
TRP	11.48	12.32	13.29	0.99	0.82	0.80	0.82
MET	4.15	4.73	4.22	0.24	0.61	0.66	0.63
VAL	27.52	29.77	31.58	0.99	0.88	0.86	0.87
PHE	9.81	10.66	12.14	0.95	0.76	0.69	0.75
ILE	8.71	11.68	13.44	0.99	0.91	0.90	0.92
LEU	17.53	21.43	19.69	0.66	0.91	0.93	0.91
LIS	31.49	36.19	37.81	0.97	0.96	0.95	0.96

Coeficientes de correlación entre niveles de aminoácidos plasmáticos (expresados en mg/l) medidos en grupos de diferente edad e igual sexo.

TABLA XIII

RELACIONES ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS

GRUPOS DE EDAD:MUJERES

	grupos			coeficientes de correlación			
A.a.	I	II	III	r (e)	r (p)	r (t)	r (S.c)
ASP	0.71	0.76	0.77	0.97	0.99	0.94	0.99
GLU	5.63	6.72	7.49	0.99	0.96	0.82	0.93
ASN	5.71	6.20	7.26	0.94	0.82	0.61	0.78
SER	15.64	13.34	15.05	- 0.38	- 0.60	- 0.81	- 0.65
GLN	79.46	84.80	92.31	0.97	0.88	0.69	0.84
THR	17.47	18.47	17.91	0.56	0.75	0.92	0.80
ARG	14.72	15.50	18.49	0.89	0.76	0.51	0.70
ALA	30.06	34.53	39.59	0.98	0.91	0.73	0.87
TIR	8.52	11.39	15.36	0.97	0.88	0.70	0.84
TRP	9.34	10.51	10.35	0.87	0.97	0.99	0.98
MET	2.03	4.02	2.52	0.37	0.59	0.81	0.65
VAL	26.39	25.22	27.41	0.33	0.08	- 0.21	0.01
PHE	9.66	9.37	10.39	0.58	0.36	0.06	0.29
ILE	9.37	9.12	10.40	0.66	0.45	0.15	0.38
LEU	17.33	15.82	19.77	0.49	0.26	- 0.04	0.18
LIS	34.75	31.84	37.51	0.36	0.11	- 0.19	0.05

Coeficientes de correlación entre niveles de aminoácidos plasmáticos (expresados en mg/l) medidos en grupos de diferente edad y sexo.

TABLA XIV

RELACIONES ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS

GRUPOS DE IGUAL EDAD Y DIFERENTE SEXO

	grupos		
A.a.	I/II	III/IV	V/VI
ASP	1.07	0.98	1.05
GLU	1.06	1.29	1.31
ASN	1.09	1.04	0.88
SER	0.80	0.89	0.88
GLN	1.09	1.11	1.04
THR	0.96	0.95	0.93
ARG	1.31	1.18	1.07
ALA	1.05	1.08	0.99
TIR	1.45	1.14	0.89
TRP	1.23	1.17	1.28
MET	2.04	1.18	1.67
VAL	1.04	1.16	1.15
PHE	1.01	1.13	1.17
ILE	0.93	1.28	1.29
LEU	1.01	1.35	0.99
LIS	0.83	1.13	1.00

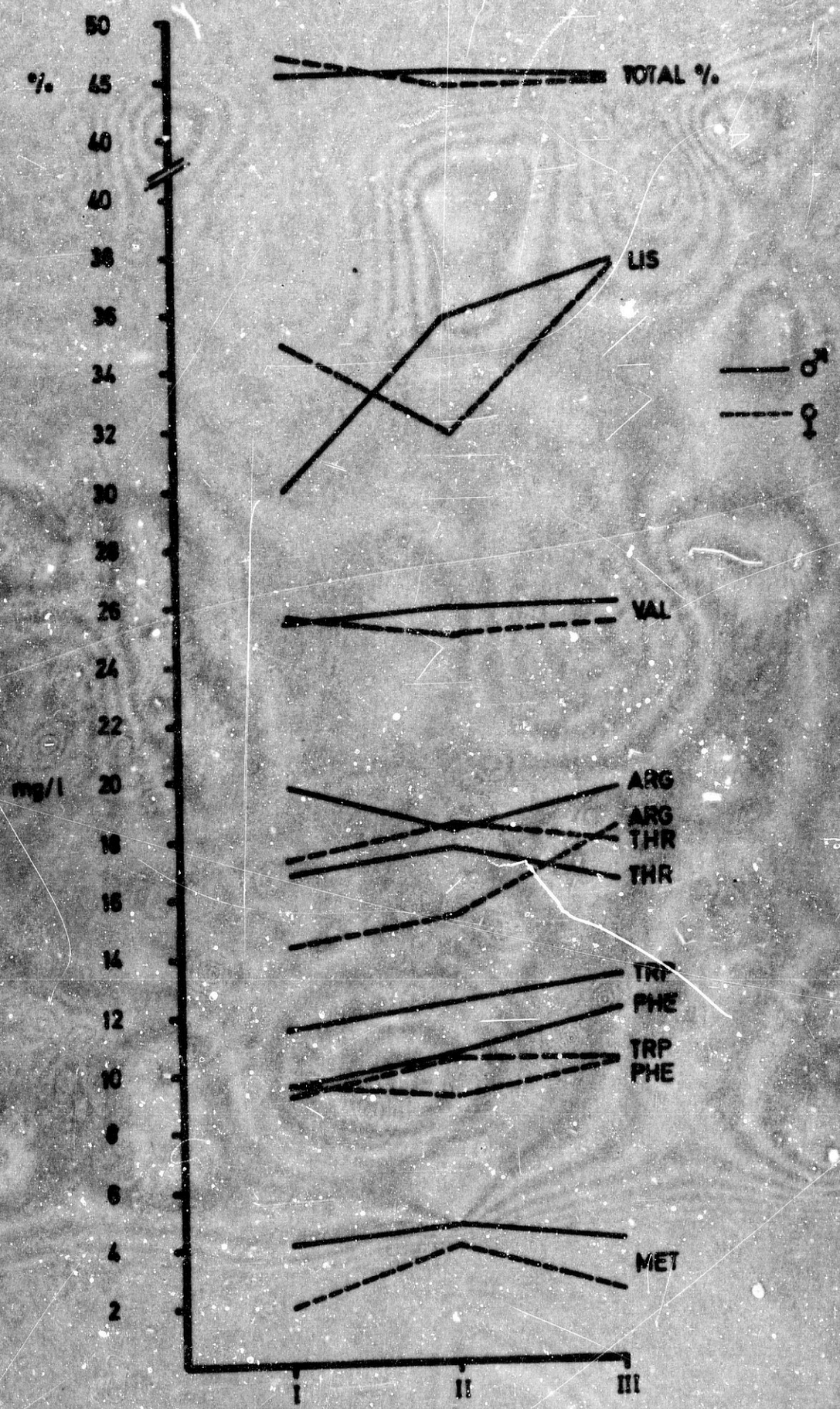
Coeficientes de correlación entre niveles de aminoácidos plasmáticos (expresados en mg/l) medidos en grupos de diferente edad e igual sexo.

VI.3.2.- DIFERENCIAS ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS DE LOS GRUPOS DE POBLACION ESTUDIADOS.

Una vez establecidas las relaciones entre los distintos aminoácidos estudiados y los grupos de población correspondientes, presentamos en las tablas XV y XVI las diferencias entre los niveles de los mismos medidos en los citados grupos que se describen en el apartado VI.2 (pag 88) y que han sido establecidas mediante la aplicación del test "t de Student". Los criterios de significación aceptados para el mismo se representan mediante signos elegidos arbitrariamente y que se corresponden con las probabilidades estadísticas siguientes:

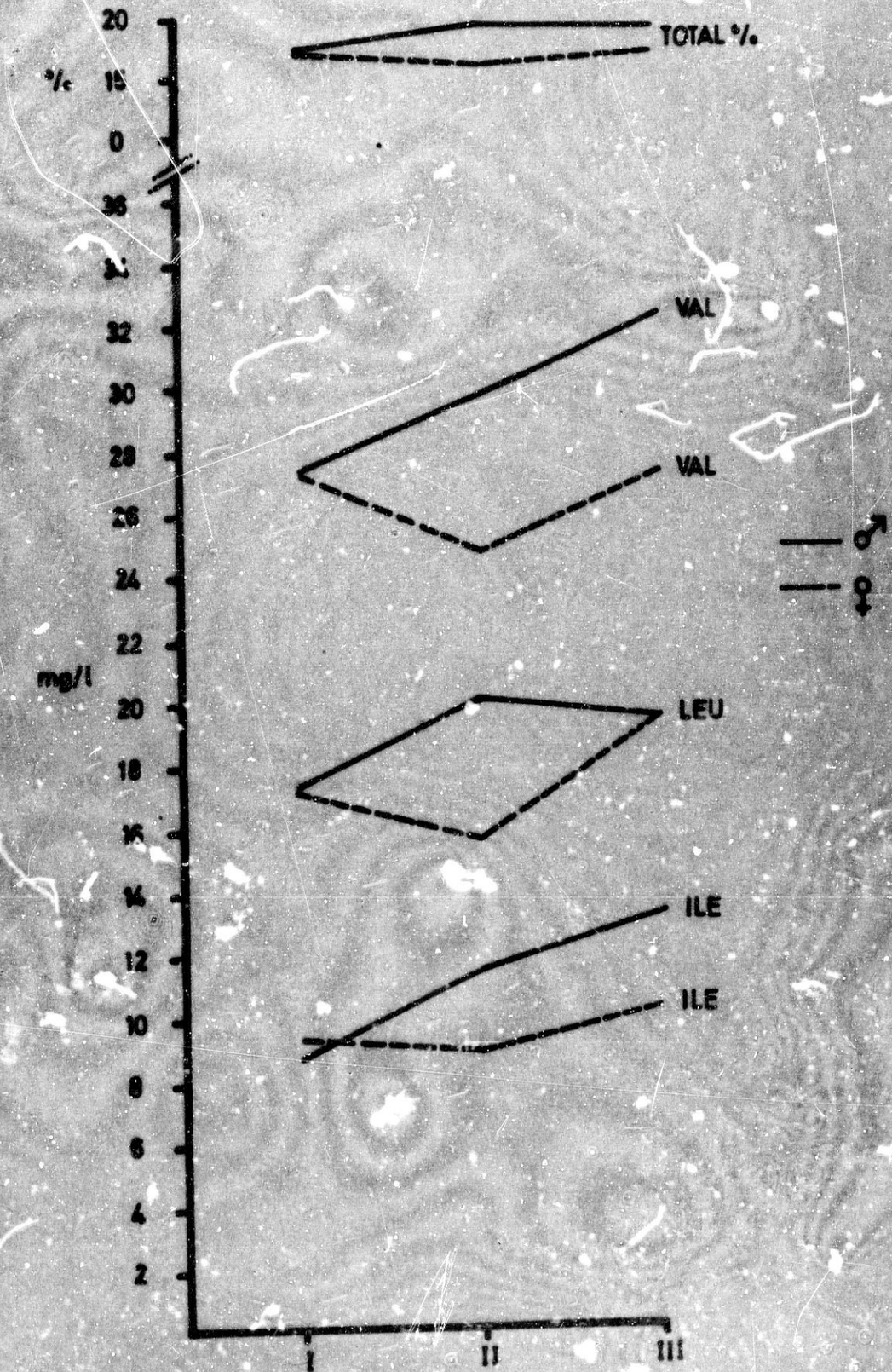
P% >	Limite aceptado para "t" (grados de libertad: 18)	Signo utilizado
0 - 50	< 0.25	-
80	> 0.86	+/-
97.5	> 2.10	++
99	> 2.50	+++

A.A. Esenciales (Cadena lineal)



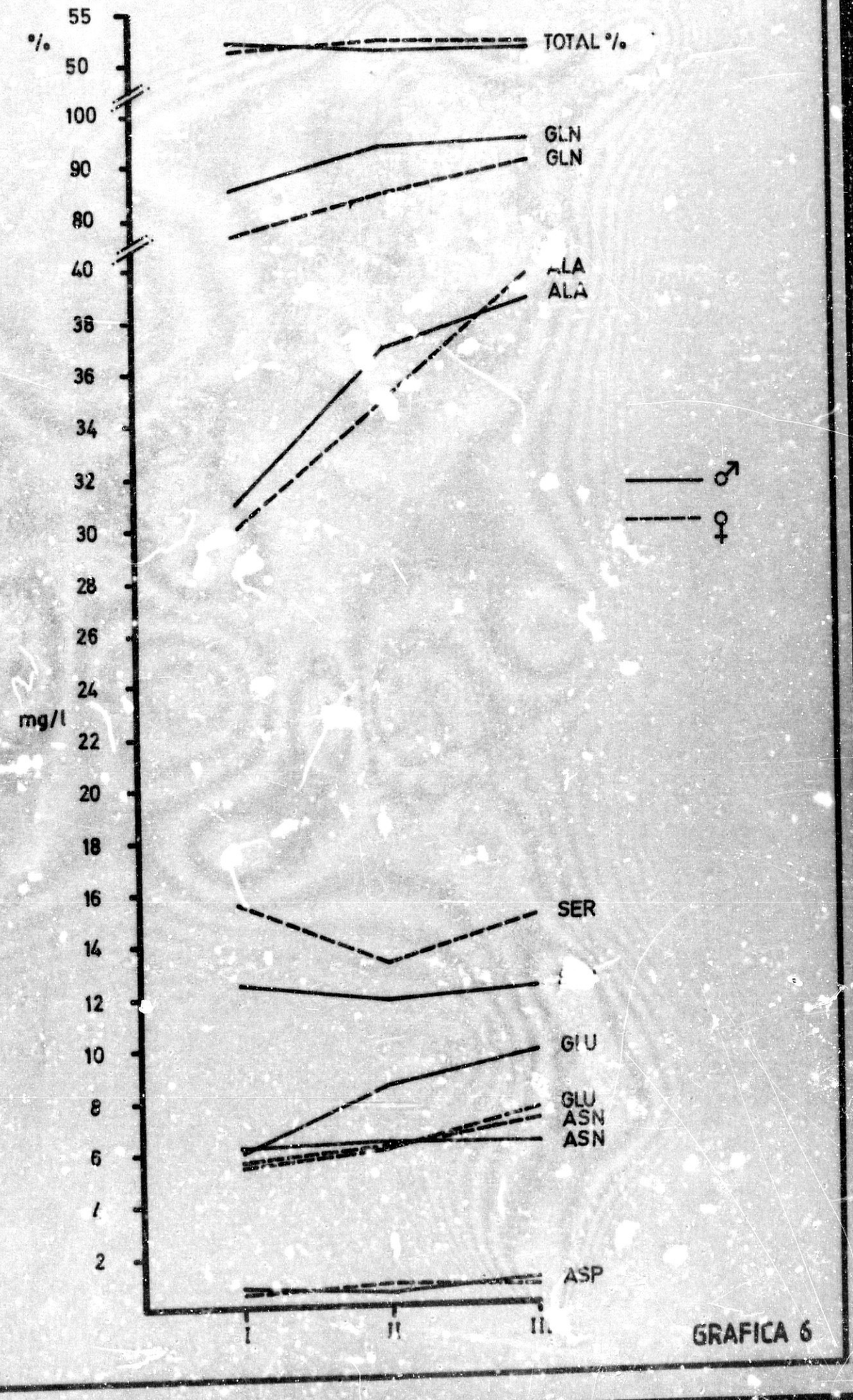
GRAFICA 4

A.A. Esenciales (Cadena ramificada)



GRAFICA 5

A.A. No Esenciales



GRAFICA 6

TABLA XV

DIFERENCIAS ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS.

COMPARACIONES ENTRE GRUPOS DE DIFERENTE EDAD Y SEXO (1)

g.comparados	ASP	GLU	ASN	SER	GLN	THR	ARG	ALA
I/II	-	+/-	+/-	+++	++	+/-	+++	+/-
I/III	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+++	+/-
I/IV	-	+++	-	+/-	++	+/-	+/-	+++
I/V	-	+++	-	+/-	+++	-	-	+++
I/VI	+/-	++	+/-	++	+	+/-	+/-	+++
II/III	-	+	+/-	++	+	+	+	++
II/IV	+/-	+++	+/-	+++	+++	-	+++	+++
II/V	+/-	+++	+/-	+++	+++	-	+++	+++
II/VI	+/-	++	++	+/-	+++	+/-	+++	+++
III/IV	+/-	++	+/-	+/-	+++	+/-	++	+/-
III/V	-	++	+/-	-	++	+	+++	++
III/VI	-	+/-	+/-	+	+++	+/-	+++	++
IV/V	+/-	+/-	-	+/-	++	+/-	+/-	+/-
IV/VI	-	+	+/-	+++	+/-	+/-	+/-	-
V/VI	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-

Significación de las diferencias entre los aminoácidos plasmáticos medidos en los diversos grupos de voluntarios estudiados. La nomenclatura de los grupos se refleja en el apartado VI.2 (pag 90), los signos arbitrarios empleados se interpretan segun la tabla de la pagina anterior

GRAFICA 7

CAUSAS DE LAS DIFERENCIAS ENTRE AMINOACIDOS

	EDAD			SEXO		INTERACCION EDAD-SEXO					
						V			H		
	I	II	III	V	H	I	II	III	I	II	III
ASP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLU	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
ASN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SER	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
GLU	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0
THR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARG	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
ALA	+	++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
TYR	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0
TRP	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
MET	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	
VAL	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
PHE	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
ILE	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
LEU	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0
LYS	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+

I = Prepuberales. + = Influencia en el citado grupo

II= Puberales. 0 = No influencia

III = Postpuberales.

TABLA XVI

DIFERENCIAS ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS

COMPARACIONES ENTRE GRUPOS DE DIFERENTE EDAD Y SEXO (2)

grupos comparados	TIR	TRP	MET	VAL	PHE	ILE	LEU	LIS
I/II	+++	+++	+++	+/-	-	+/-	-	++
I/III	+/-	+/-	+/-	+	+++	+/-	+/-	-
I/IV	+/-	+/-	++	+/-	+/-	+++	++	++
I/V	+	++	-	++	++	+++	+	+++
I/VI	+++	+/-	+++	-	+/-	+	+	+++
II/III	+++	+/-	+++	+	+/-	+/-	+/-	++
II/IV	+++	+++	+++	++	+/-	++	++	+/-
II/V	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	++
II/VI	+++	+/-	++	+/-	+/-	+/-	+	++
III/IV	+	+/-	++	+++	+	++	+++	++
III/V	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
III/VI	+++	+/-	+++	+	+/-	+/-	+++	+++
IV/V	+/-	+/-	++	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
IV/VI	++	+	+++	+/-	-	+/-	+/-	+/-
V/VI	+	++	+++	++	+	++	+/-	-

Significación de las diferencias entre los aminoácidos plasmáticos medidos en los diversos grupos de voluntarios estudiados. La nomenclatura de los grupos se relejan en el apartado VI.2 (pag 90), los signos arbitrarios empleados se interpretan segun la tabla de la página anterior.

VI.5.3.- CAUSAS DE LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS

Una vez establecidos los ambitos de normalidad para los aminoácidos plasmáticos en diferentes grupos representativos de la población general, así como las diferencias y relaciones entre los mismos, hemos estudiado las causas a que estas pueden obedecer aplicando para ello los métodos de análisis de varianza que se citan en el apartado V.8 (pagina 82) a los resultados obtenidos.

En la tabla XVII y gráfica (7) que a continuación presentamos se recogen los resultados de dicho análisis. En este caso hemos considerado significativos los referidos resultados exclusivamente cuando los valores de F obtenidos en el análisis de las varianzas correspondientes a los mismos, eran superiores a los del límite correspondiente a P = 95 %.

Los signos utilizados para representar dichos criterios de significación se recogen en la tabla siguiente:

P% >=	Límite aceptado para F	Signo utilizado
0.0	variable en función	-
95.0	de grados de libertad	+
97.0		++
99.0		+++

TABLA XVII

INFLUENCIAS EN LAS MODIFICACIONES DE LOS AMINOACIDOS

Grupos estudiados

A.a.	EDAD			SEXO		INTERACCION DE SEXO Y EDAD					
	I-II	III-IV	V-VI	M	F	M			F		
						I	III	V	II	IV	VI
ASP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ASN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
GLU	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
THR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARG	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-
ALA	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
TIR	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
TRP	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MET	-	+	-	++	-	+	+	+	-	+	-
VAL	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PHE	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ILE	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LEU	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
LIS	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+

Influencia de la edad, sexo,e interacción entre ambos en los niveles de aminoácidos.Los signos arbitrarios utilizados se interpretan segun la tabla de la pagina anterior.

VI.4: MODIFICACIONES DE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS INDUCIDAS POR STRESS.

Una vez expuestos los resultados correspondientes a los ambitos de normalidad para los aminoácidos, presentaremos a continuación los correspondientes a las modificaciones que se producen en los niveles mencionados a consecuencia de agresiones externas que pueden producir modificaciones complejas del metabolismo y que clásicamente se agrupan bajo la denominación de stress.

Dado que estos tipos de fenómenos metabólicos estan fuertemente regulados por mecanismos endocrinos cuyo origen se encuentra en el eje hipotalamo-hipofisis-suprarrenal, hemos realizado experiencias orientadas a establecer las relaciones entre las principales hormonas de dicha procedencia y la evolución de los niveles de aminoácidos en plasma. Con este fin, hemos comparado los niveles de aminoácidos medidos en muestras obtenidas tras situaciones patológicas inductoras de stress (traumatismos craneo-encefálicos sin afectación de masa muscular),con los medidos en muestras procedentes de voluntarios a los que se les estimuló la secreción de glucocorticoides mediante la administración de ACTH tratando de simular de esta forma algunos aspectos endocrinos del stress,y como con los niveles de cortisol medidos en las mismas muestras que se recogen en la siguiente tabla.

CORTISOL PLASMATICO TRAS ADMINISTRACION I.V. DE ACTH.

tiempos de obtención de muestras

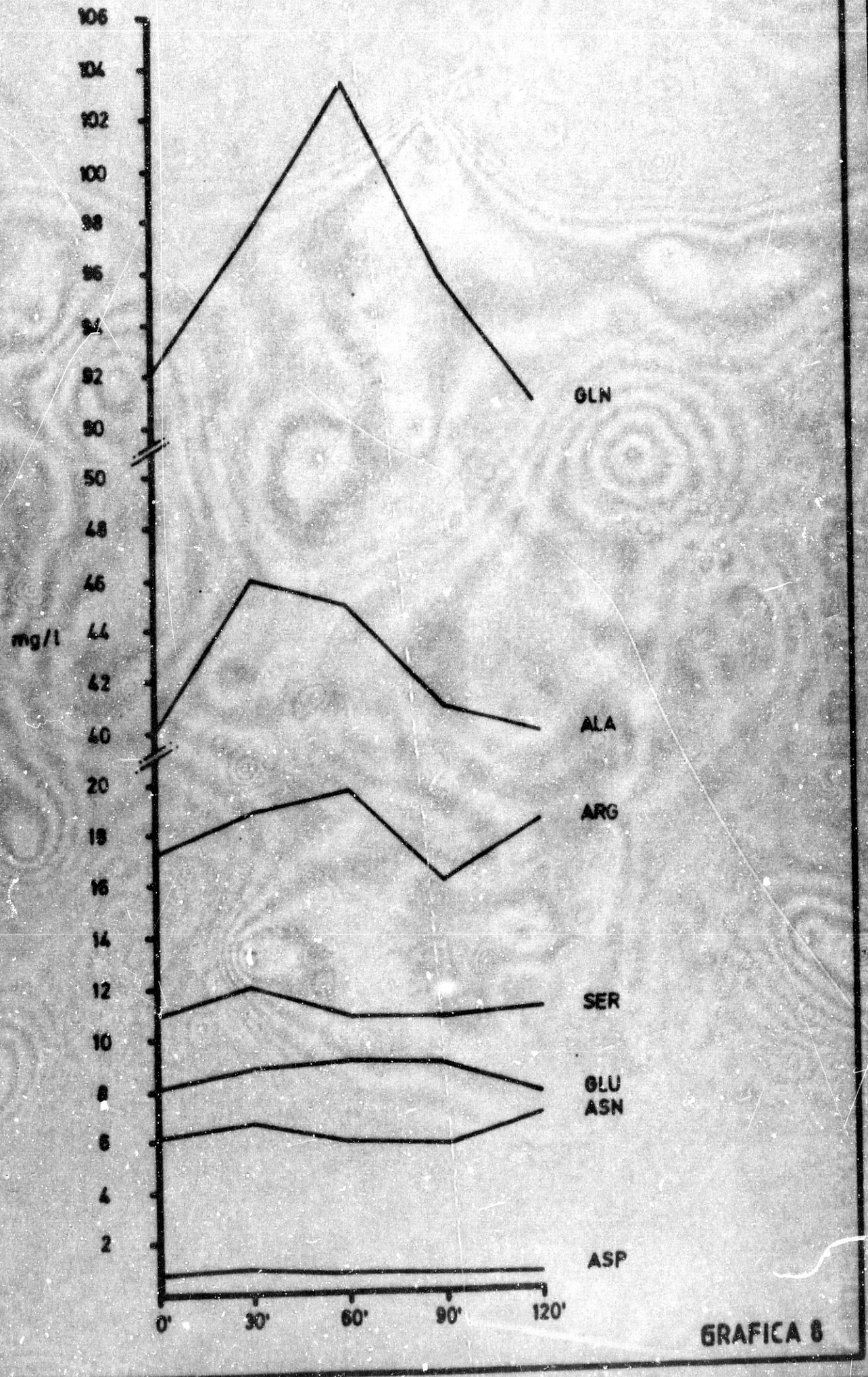
	0	30	60	90	120	min. tras ACTH
CORTISOL	114	280	265	231	206	ng/ml
CASOS	5	5	5	5	5	

CORTISOL PLASMATICO EN T.C.E.

tiempos de obtencion de muestras

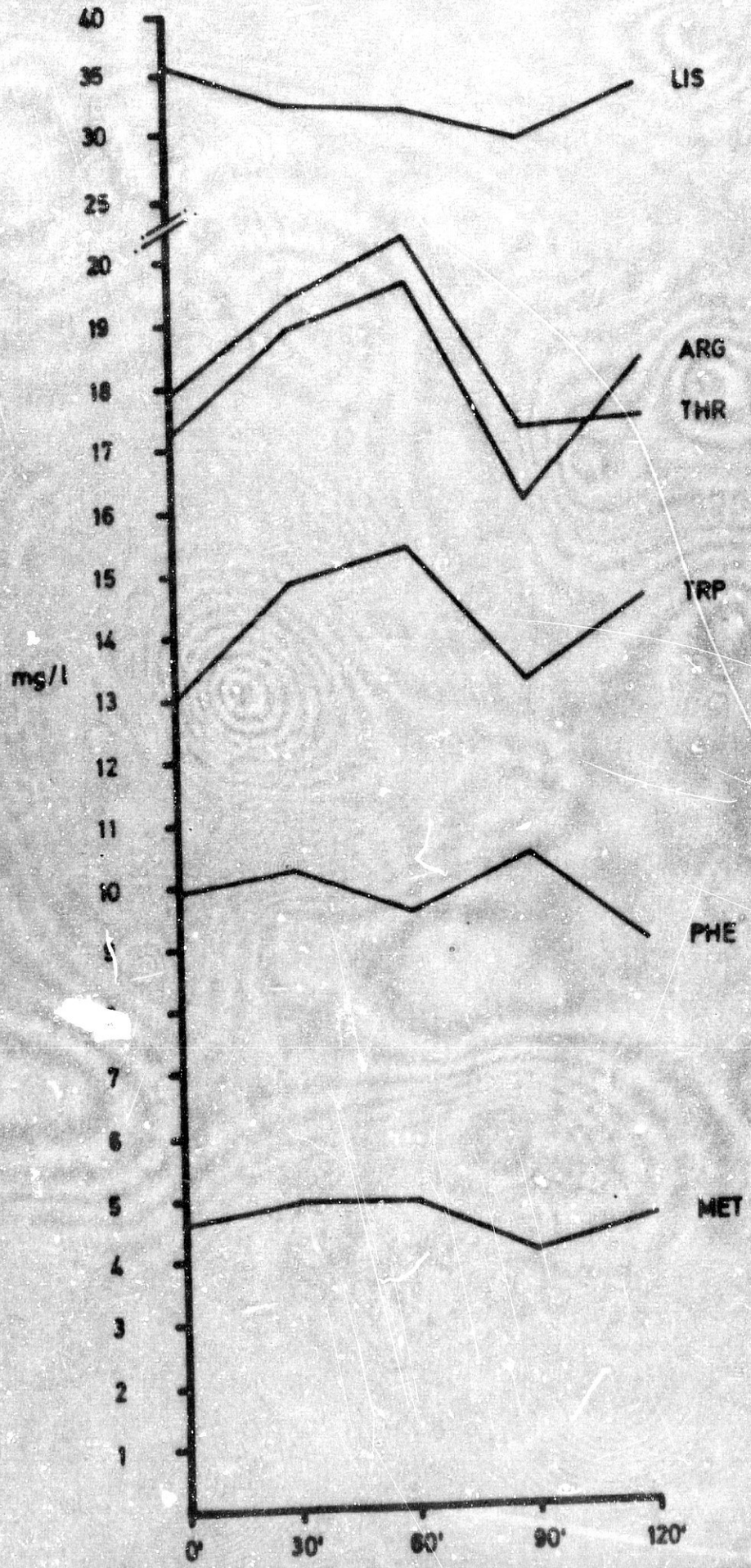
	INM	24	48	72	168	h. tas T.C.E
CORTISOL	350	338	290	177	125	ng/ml
CASOS	13	18	14	13	9	

A. A. No Esenciales tras estimulo con A.C.T.H.



GRAFICA 8

A.A. Esenciales (cadena lineal) tras estimulo con A.C.T.H.



GRAFICA 9

A.A. Esenciales

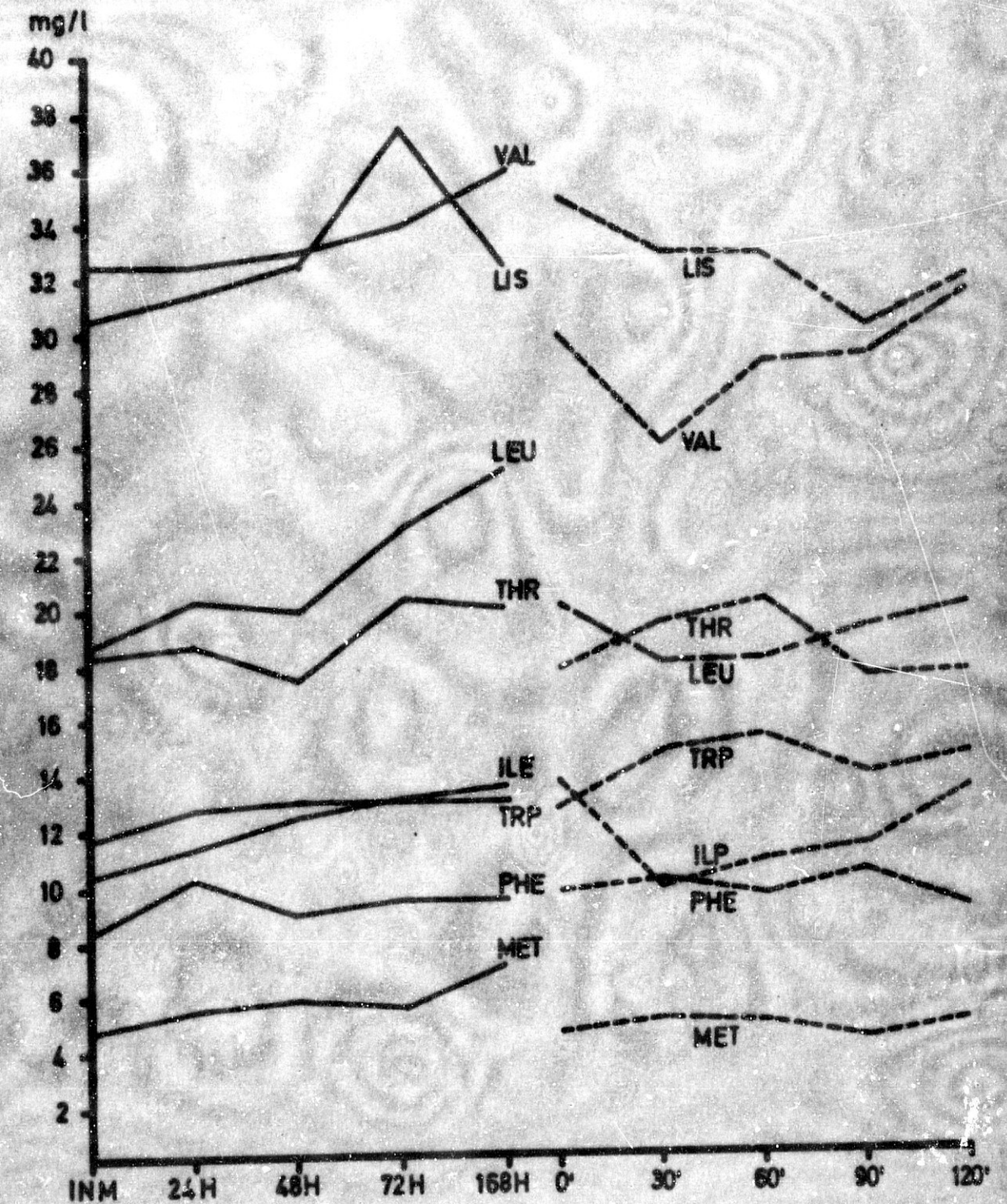
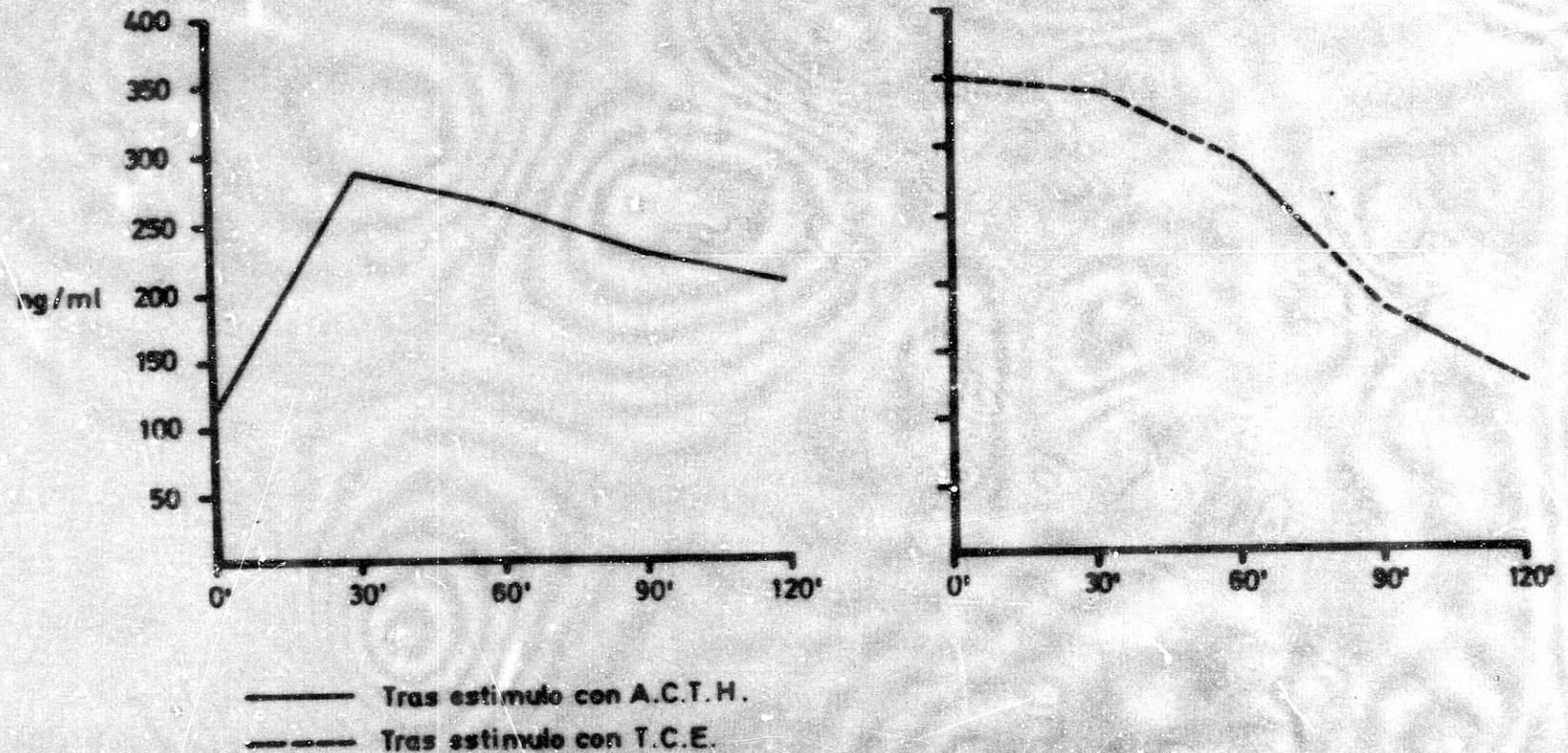


GRAFICO 10

CORTISOL



GRAFICA 10 bis

VI.4.1.- ADMINISTRACION DE ACTH, T.C.E Y NIVELES DE AMINOACIDOS EN PLASMA.

Los niveles de aminoácidos, expresados en mg/l, consecutivos a la administración de ACTH que han sido medidos según el método descrito en el apartado (V.8) en el grupo de muestras obtenidas de los 5 voluntarios que se citan en el apartado IV. 1.1.1 , se recogen en la tabla XVIII que figura a continuación. Los resultados que presentamos corresponden a los valores medios de 5 mediciones.

En las tabla XVIII presentamos los valores medios expresados en mg/l, referentes a la evolución de los niveles de aminoácidos de los grupos de pacientes sometidos a stress físico inducido por TCE que se relacionan en el apartado número IV.1.1.2, dichos grupos son de tamaño variable debido a las características de la evolución clínica de cada paciente que en algunas ocasiones nos impidio la obtención de las correspondientes muestras, las causas mas frecuentes que ocasionaron este impedimento fueron las de haber transcurrido tiempos muy largos desde la instauración de TCE y el ingreso hospitalario en algunos de los casos estudiados y la del fallecimiento del paciente en otros.

TABLA XVIII

NIVELES DE AMINOACIDOS EN PLASMA TRAS ADMINISTRACION DE ACTH

tiempos de obtención de las muestras

(minutos tras administrar ACTH)

A.a.	0'	30'	60'	90'	120'
ASP	0.81	0.98	0.92	0.88	0.83
GLU	8.11	8.92	9.16	9.03	7.92
ASN	6.27	6.78	6.01	5.89	6.91
SER	10.87	11.94	10.93	10.13	11.07
GLN	92.23	98.65	100.38	96.75	91.17
THR	17.85	19.46	21.93	17.32	17.51
ARG	17.32	18.96	19.74	16.22	18.47
ALA	35.93	46.11	44.93	41.79	40.60
TRP	12.94	14.82	15.42	13.29	14.62
MET	4.58	4.92	4.87	4.21	4.68
VAL	30.08	26.16	28.93	29.14	31.98
PHE	9.86	10.27	9.64	10.59	9.06
ILE	13.84	10.02	10.69	11.32	13.28
LEU	21.16	18.03	18.16	19.32	20.02
LIS	35.13	32.31	32.39	30.16	34.13

Aminoácidos plasmáticos, medidos en mg/l, antes y a distintos tiempos, tras la administración de 25 unidades de ACTH intravenosa a 5 voluntarios sanos.

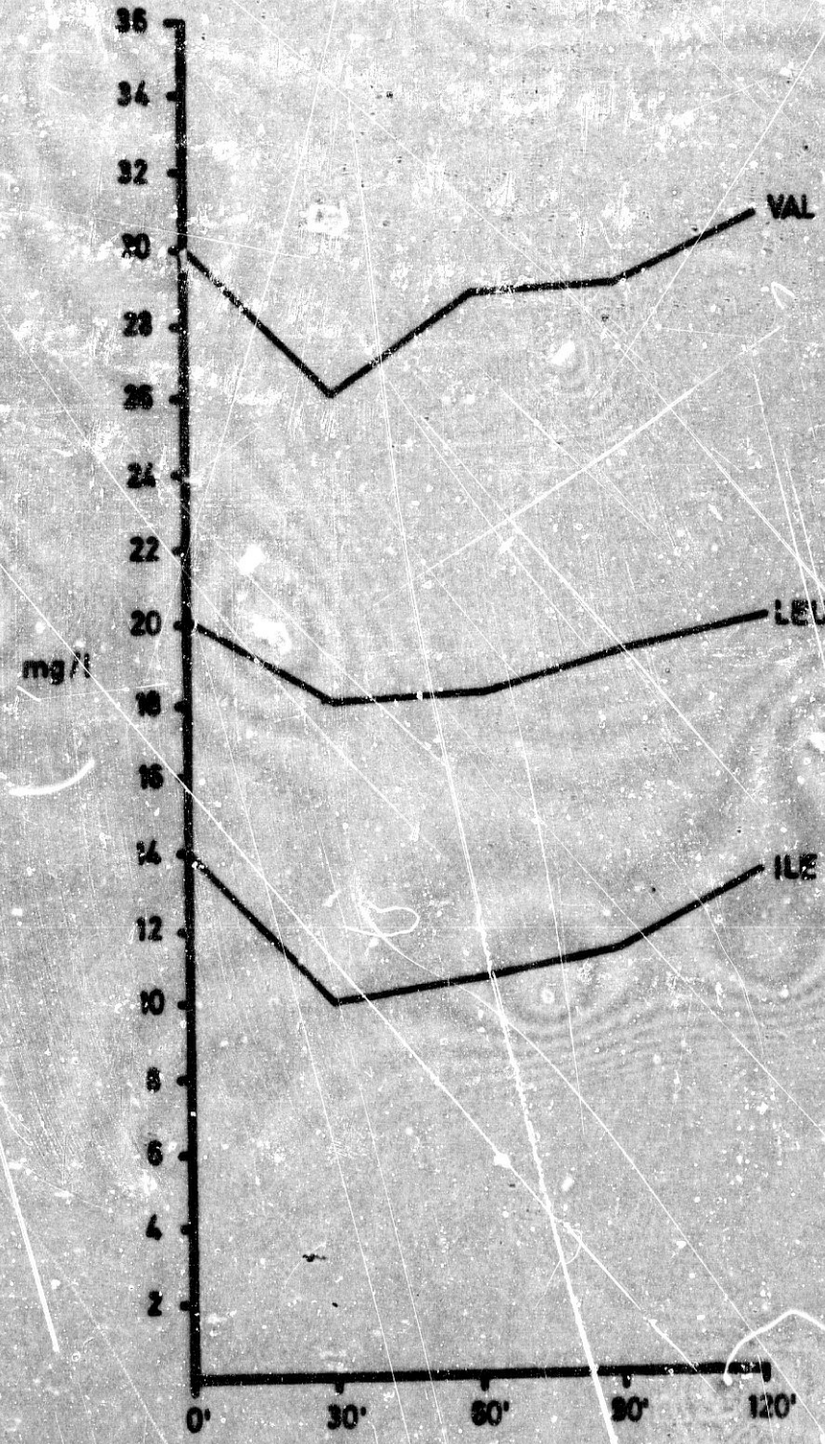
TABLA XIX

NIVELES DE AMINOACIDOS EN PLASMA TRAS T.C.E.

A.a.	Inm.	24 h	48 h.	72 h.	168 h.
ASP	0.83	0.62	0.77	0.86	0.81
GLU	6.01	7.21	6.43	6.41	7.31
ASN	4.20	5.67	5.89	6.42	4.31
SER	11.63	12.44	12.50	13.76	12.15
GLN	86.4	88.14	80.56	90.82	66.17
THR	18.35	18.71	17.55	22.04	20.73
ARG	17.18	18.57	17.96	20.19	20.71
ALA	38.27	55.34	51.19	48.92	43.52
TIR	12.26	15.19	16.11	14.28	13.17
TRP	11.81	12.71	12.93	13.05	13.12
MET	4.82	5.54	5.82	5.68	7.01
VAL	30.38	31.5	32.89	34.30	35.93
PHE	8.39	10.24	9.12	9.56	9.58
ILE	10.39	11.84	12.32	13.17	14.65
LEU	18.82	21.41	20.44	22.97	25.79
LIS	32.92	32.24	33.09	38.07	33.89
CASOS	13	18	14	13	9

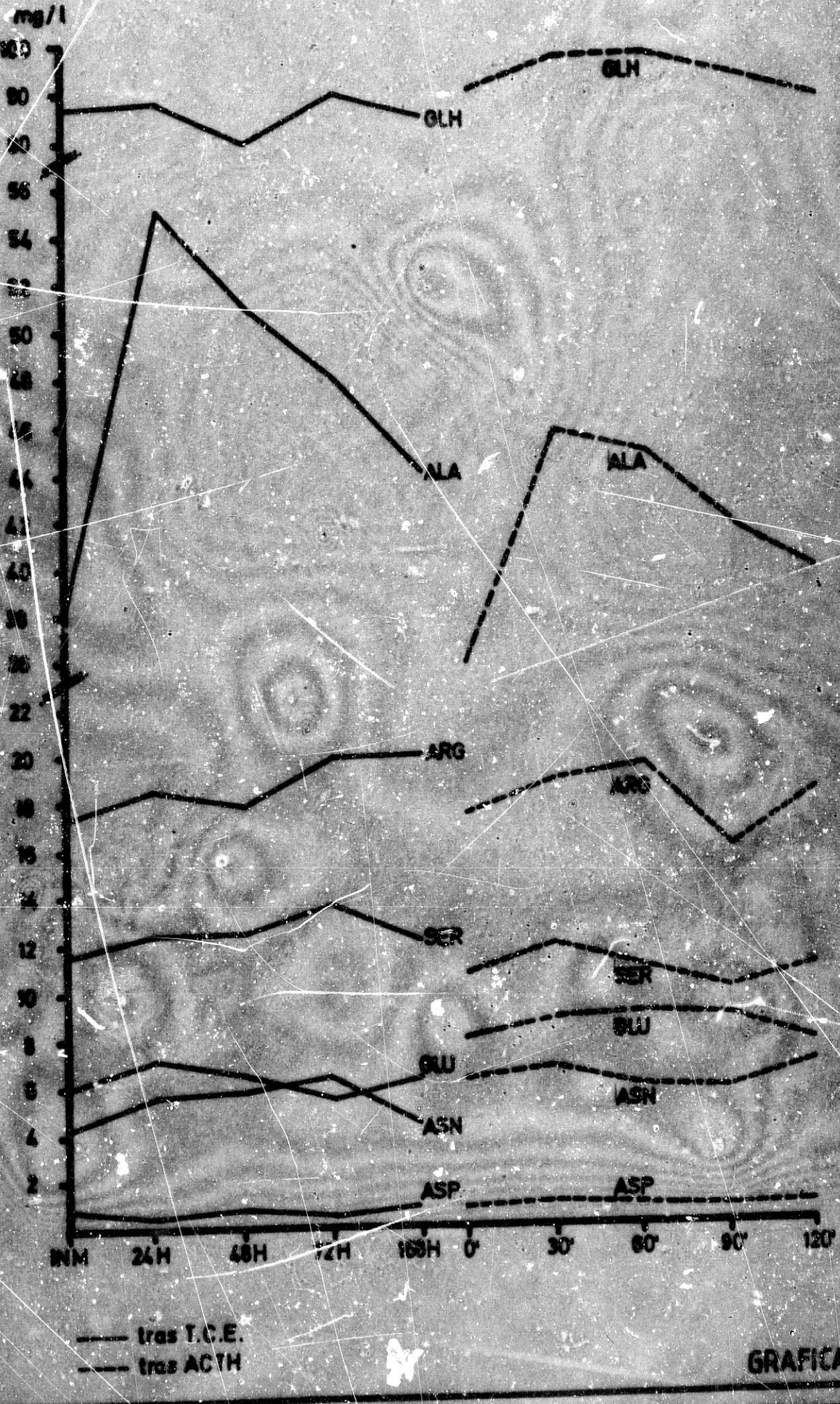
Aminoácidos plasmáticos medidos en mg/l. de forma inmediata y a distintos tiempos tras la instauración de T.C.E.

A. A. Esenciales (cadena ramificada) tras estimulo con A.C.T.H.



GRAFICA 11

A.A. no Esenciales



GRAFICA 12

VI.4.2.- RELACIONES ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS TRAS ADMINISTRACION DE ACTH Y TRAS T.C.E.

Una vez establecidos los niveles de aminoácidos en plasma tras la administración de ACTH así como a continuación de un traumatismo craneo encefálico, exponemos a partir de este momento los resultados, de las comparaciones entre todos los datos mencionados; las significaciones estadísticas de las diferencias entre los mismos, se han establecido según el protocolo que a continuación exponemos.

1: Para el establecimiento de las significaciones estadísticas tanto de las diferencias entre los valores medios de los aminoácidos medidos a tiempos variables (0' 30' 60' y 120') tras un mismo tratamiento (administración de ACTH) ó los medidos a tiempos tambien variables (Inm, 24 h, 48 h, 72 h, y 168 h,) tras ciertas alteraciones patológicas (T.C.E.), así como las diferencias entre los de ambas series entre si, hemos utilizado el test "t de Student" de comparación de medias.

Los resultados obtenidos con dicho test se presentan en la grafica (7) mediante signos elegidos de forma arbitraria que se corresponden con las probabilidades estadísticas que presentamos en la tabla siguiente

P% >	Límite aceptado para "t"	Signo utilizado
0 - 50	< 0.25	-
60	> 0.36	+/-
80	> 0.87	+/-
90	> 1.35	+
95	> 1.77	++
97.5	> 2.16	++
99	> 2.87	+++

2: El paralelismo o la disparidad entre la evolución de los niveles de aminoácidos medidos en muestras obtenidas bajo diferentes condiciones (administración de ACTH ó T.C.E.), así como la relación de dichos niveles con los de cortisol medido en las mismas muestras, han sido definidos por el coeficiente de correlación calculado para los datos citados. El límite de significación estadística aceptado para las mencionadas correlaciones ha sido establecido en r = 0.80, P = 0.95.

Dado que las comparaciones citadas han sido efectuadas tanto entre la totalidad de las medidas efectuadas en todas las experiencias como entre parte de las mismas, la simplificación de la presentación de los resultados obtenidos nos ha hecho utilizar el código que presentamos a continuación para referirnos a sus resultados, en las gráficas (10 y 12) se representan las evoluciones de los aminoácidos esenciales y no esenciales medidos a diferentes tiempos tratados con ACTH y de pacientes afectados por TCE.

Comparación de resultados de	Medidos a tiempos	Código usado
A.a.tras ACTH con Cortisol	0',30',60',90',120'.	A
" " "	30', 60', 90'.	B
A.a. tras TCE con Cortisol	Inm,24h,48h,72h,168h.	C
" " "	24h,48h,72h,168h.	D
" " "	24h,48h,72h	E
A.a. tras TCE con A.a tras ACTH	Inm-0',24h-30',48h-60', 72h-90',168h-120'.	F
" " "	Inm-0',24h-30',48h-60', 72h-90'.	G
" " "	24h-30',48h-60',72h-90'.	H

3: La evolución global de los niveles de aminoácidos tras la administración de ACTH, así como tras la instauración de un traumatismo craneo encefálico (T.C.E.), la hemos estudiado estableciendo y comparando posteriormente entre sí los niveles totales, expresados porcentualmente, de los aminoácidos que se metabolizan en el organismo siguiendo vías similares, y que hemos agrupado de la manera siguiente:

aminoácidos esenciales.

aminoácidos no esenciales.

aminoácidos de cadena ramificada.

En las tablas y gráficas que a continuación presentamos, se recogen todos los resultados a que nos hemos referido en los párrafos anteriores.

TABLA XX

DIFERENCIAS ENTRE AMINOACIDOS TRAS ADMINISTRACION DE ACTH

tiempos comparados (minutos tras administración de ACTH)

	0				30			60		90
	30	60	90	120	60	90	120	90	120	120
A.a										
ASP	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
GLU	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	+/-	+/-
ASN	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-
SER	-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
GLN	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	++	+/-
THR	+/-	+++	+/-	-	+	+/-	+/-	+++	+++	-
ARG	+/-	+/-	+	-	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-
ALA	+++	+++	+	+/-	+/-	+	+++	+/-	++	+
TRP	+	++	++	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-
MET	+/-	+/-	+/-	-	-	+++	+/-	++	+/-	+
VAL	+	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+++	-	+/-	+/-
PHE	+/-	+/-	-	+	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
ILE	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-
LEU	+	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
LIS	+	+	++	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-

Significación estadistica(segun tabla pag 113) de la diferencias entre los niveles de aminoácidos medidos a tiempos diferentes en muestras obtenidas de cinco voluntarios a los que se administró 25 U de ACTH.

TABLA XXI

DIFERENCIAS ENTRE AMINOACIDOS EN PLASMA TRAS T.C.E.

tiempos comparados (horas tras el origen del T.C.E)

	INM.				24			48		72
	24	48	72	168	48	72	168	72	168	168
A.a.										
ASP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GLU	++	++	+++	++	+	++	+	-	-	-
ASN	+++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
SER	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	+
GLN	-	-	-	+/-	++	++	++	+++	+++	+/-
THR	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+++	+++	+/-
ARG	+	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++
ALA	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++
TRP	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
MET	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VAL	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
PHE	++	+++	+++	++	++	++	++	-	-	-
ILE	++	++	++	++	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
LEU	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+
LIS	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+

Signifacación estadistica (segun tabla pag 115) de las diferencias entre los niveles de aminoácidos medidos a tiempos diferentes de muestras obtenidas de pacientes afectados de TCE

TABLA XXII

DIFERENCIAS ENTRE AMINOACIDOS TRAS ACTH Y TRAS T.C.E.

A.a.	0'-INM.	30'-24h	60'-48h	90'-72h	120'-168h
ASP	-	++	+++	+++	+++
GLU	++	++	+++	+	++
ASN	+++	++	-	+/-	++
SER	+/-	+/-	-	-	+/-
GLN	+/-	++	+++	+/-	+
THR	+/-	-	-	++	+++
ARG	-	-	-	++	+++
ALA	+/-	+++	++	++	+/-
TRP	+/-	+/-	+	-	+/-
MET	+/-	+++	-	+++	+++
VAL	-	++	+/-	++	+
PHE	+/-	-	-	+/-	-
ILE	++	+	+	+/-	+
LEU	+/-	+/-	+/-	+	++
LIS	+/-	-	-	++	-

Significación estadística de las diferencias entre los niveles de aminoácidos medidos en voluntarios a los que se administra ACTH y pacientes afectados de TCE , a los tiempos que se indican en el encabezamiento.

TABLA XXIII

COMPARACION ENTRE LOS NIVELES DE AMINOACIDOS Y DE CORTISOL TRAS ESTIMULO CON ACTH.

	A	B
ASP	0.99	0.90
GLU	0.71	0.73
ASN	- 0.07	0.08
SER	0.60	0.37
GLN	0.86	0.79
THR	0.68	0.55
ARG	0.64	0.50
ALA	0.99	0.89
TRP	0.45	0.75
MET	0.59	0.40
VAL	- 0.94	- 0.62
PHE	0.46	0.23
ILE	- 0.95	- 0.92
LEU	- 0.98	- 0.97
LIS	- 0.22	- 0.67

Coeficientes de correlación entre los niveles de aminoácidos y los de cortisol medidos en los mismos sujetos (ver esquema pag 114)

TABLA XXIV

COMPARACION ENTRE LOS NIVELES DE AMINOACIDOS Y DE CORTISOL TRAS T.C.E.

	C	D	E
ASP	0.18	0.57	- 0.17
GLU	0.46	0.99	0.75
ASN	- 0.03	- 0.59	0.45
SER	- 0.44	- 0.97	- 0.18
GLN	- 0.23	- 0.47	0.29
THR	- 0.81	- 0.85	- 0.79
ARG	- 0.94	- 0.85	- 0.93
ALA	0.12	0.93	0.96
TIR	0.15	0.68	0.86
TRP	- 0.74	- 0.92	- 0.94
MET	- 0.89	- 0.29	- 0.75
VAL	- 0.98	- 0.99	- 0.99
PHE	- 0.26	0.40	0.32
ILE	- 0.93	- 0.99	- 0.96
LEU	- 0.92	- 0.77	- 0.89
LIS	- 0.62	- 0.98	- 0.59

Coeficientes de correlación entre los niveles de aminoácidos y los de cortisol medidos en los mismos sujetos (ver esquema pag. 114)

TABLA XXV

COMPARACION ENTRE LOS NIVELES DE AMINOACIDOS PLASMATICOS TRAS T.C.E. FRENTE A NIVELES TRAS ESTIMULO CON ACTH.

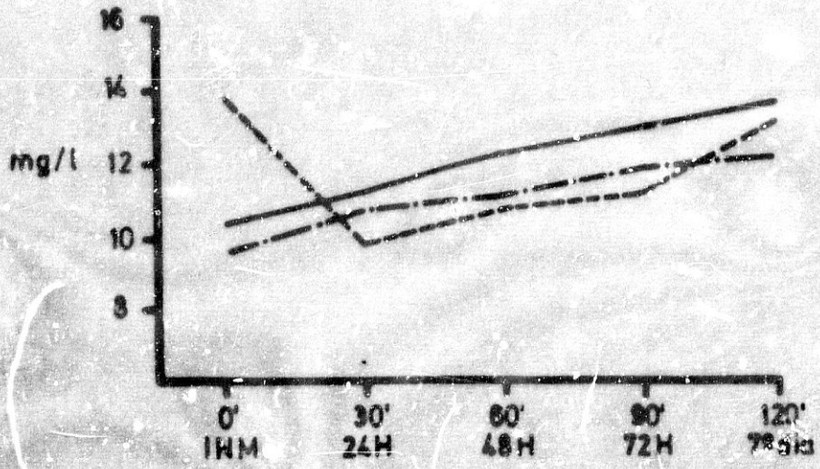
	F	G	H
ASP	- 0.59	- 0.45	- 0.26
GLU	0.09	0.15	- 0.35
ASN	- 0.66	- 0.31	- 0.81
SER	- 0.52	- 0.52	- 0.85
GLN	- 0.28	- 0.41	- 0.96
THR	- 0.76	- 0.71	- 0.95
ARG	- 0.27	- 0.49	- 0.99
ALA	0.80	0.98	0.92
TRP	0.56	0.52	- 0.57
MET	0.10	0.11	- 0.06
VAL	0.53	0.83	0.66
PHE	0.24	0.60	0.55
ILE	- 0.006	- 0.68	- 0.98
LEU	- 0.04	- 0.52	- 0.89
LIS	- 0.62	- 0.73	- 0.99

Coeficientes de correlación entre los niveles de aminoácidos y los de cortisol, medidos en los mismos sujetos (ver esquema pag 114).

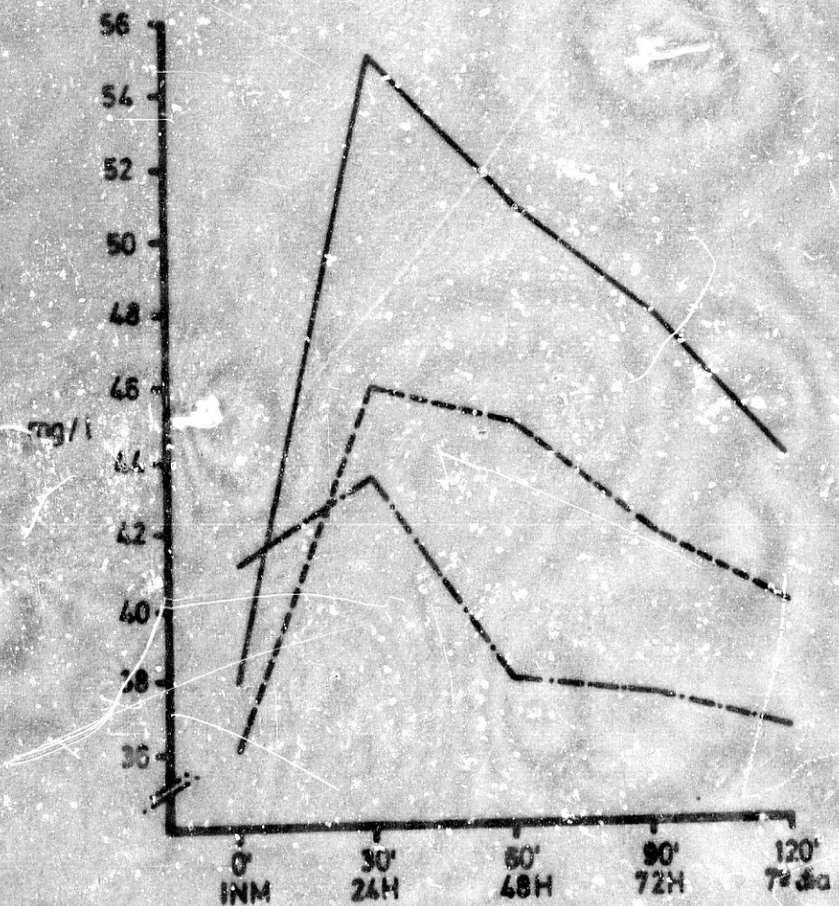
VI.5.- RELACIONES ENTRE LAS VARIACIONES EN LOS NIVELES DE AMINOACIDOS PLASMATICOS EN INDIVIDUOS SOMETIDOS A STRESS.

Resultados recogidos en bibliografía (114) afirman que en pacientes politraumatizados los niveles de aminoácidos de cadena ramificada, muestran incrementos que se corresponden a una hiperglucemia refractaria a la insulina, y a un descenso de los niveles de alanina. Nosotros observamos, en nuestros estudios con pacientes sometidos a stress mediante la administración de ACTH y en sujetos sometidos a T.C.E., la aparición de modificaciones análogas a las que se producian en el caso anterior. en las gráficas 10, 10 bis, 11, 12, 13 y 14 se recogen las evoluciones de los aminoácidos de cadena ramificada y los de la alanina en los casos citados. En ellas se observa como existe una evolución opuesta de los aminoácidos de cadena ramificada en el tratamiento con ACTH y en sujetos a TCE y politraumatizados

ILE



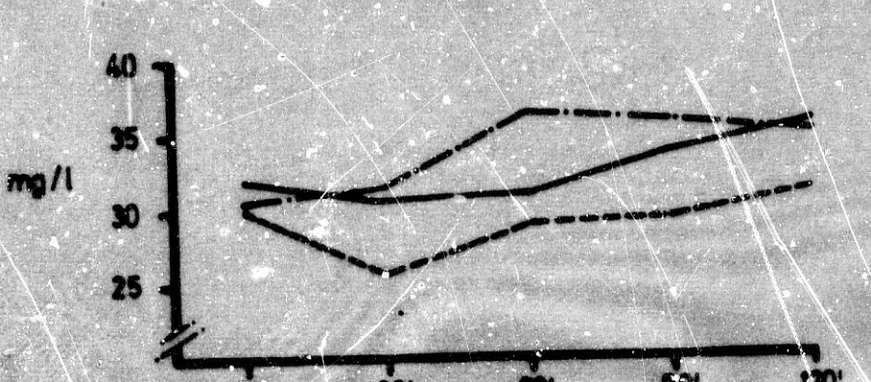
ALA



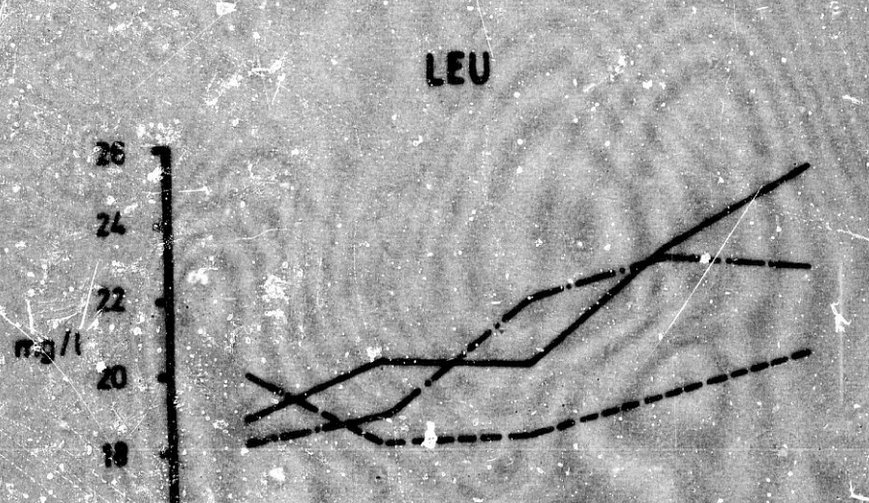
——— tras TCE
– – – – tras ACTH
—·—·— tras POLITRAUMATIZADOS

GRAFICA 13

VAL



LEU



——— tras TCE
——— tras ACTH
——— tras POLITRAUMATIZADOS

GRAFICA 14

VII.- DISCUSION.

VII.1.- MARCO DE LA PRESENTE INVESTIGACION.

A menudo, el estudio de los mecanismos fisiopatológicos relacionados con el proceso hipercatabólico que se establece en un organismo sometido a una lesión mas o menos grave, así como el de los profundos cambios tanto cualitativos como cuantitativos observados en las moléculas nitrogenadas en el mencionado organismo, han sido enfocados desde el punto de vista del metabolismo de aminoácidos. En algunas ocasiones la información obtenida en las investigaciones realizadas, ha proporcionado bases efectivas que han permitido modificar los tratamientos aplicados.

La regulación hormonal de los procesos que inducen los mencionados estados hipercatabólicos y su reflejo en los niveles plasmáticos de aminoácidos,es uno de los aspectos menos revisados de este campo que ha sido enfocado clásica y prioritariamente al estudio del metabolismo de aminoácidos y de sus alteraciones en pacientes sometidos a diversos tipos de intervenciones quirúrgicas ó a politraumatismos, igualmente han sido utilizados para estudios de este tipo diversas especies de animales de experimentación. Los hechos citados, nos han orientado hacia el planteamiento que del presente trabajo queda hecho,en el capítulo correspondiente a objetivos,y que dicho en breves lineas consiste en la puesta a punto de una metodología adecuada mediante la cual hemos establecido los

valores de referencia para los aminoácidos plasmáticos,para a continuación establecer las modificaciones que en los mismos se inducen a consecuencia de las alteraciones hormonales secundarias al stress.

La medición en muestras biológicas de los aminoácidos incluia hasta hace bien pocos años la utilización de tecnicas de fraccionamiento largas, engorrosas y a menudo sumamente erroneas que dificultaban enormemente el estudio de las alteraciones que pudieran producirse en su metabolismo.

La aparición en los ultimos 15 años,de metodologias revolucionarias en los aspectos mencionados, nos hizo plantearnos su revisión y puesta a punto para utilizarlas en la medida de los niveles de aminoácidos.

Los valores de referencia de los aminoácidos plasmáticos tablas VI y XI, los hemos establecido en grupos de población normal seleccionados en función del sexo y de la edad (estado de desarrollo hormonal) de la manera que se recoge en la tabla I del capitulo correspondiente a material y métodos. Es evidente que la existencia de estos grupos, condiciona el establecimiento de varios tipos de parámetros, de entre los que hemos empleado los correspondientes al peso, la talla y la superficie corporal para referir a ellos los aminoácidos medidos.

Una vez establecidos estos datos, los hemos utilizado como base del estudio de la influencia del stress, considerado como causante y origen del sindrome de adaptación, en los ni-

veles de los aminoácidos plasmáticos de sujetos en los que dicho stress se indujo artificialmente (administración i.v. de ACTH) y en sujetos que lo sufrían como consecuencia de un traumatismo craneoencefálico (T.C.E.) sin lesión muscular asociada.

VII.2.- ANALISIS DE AMINOACIDOS.

La técnica cromatográfica (HPLC) de separación y análisis de aminoácidos revisada y puesta a punto por nosotros, ofrece la ventaja de disminuir drásticamente el tiempo de análisis de las aproximadamente 8 horas que son necesarias si se utiliza alguno de los sistemas clásicos de análisis automatizado en colúmna de cambio iónico, a los 45 minutos que hemos conseguido con nuestro método.

La columna que dicha técnica emplea como base, es de tipo apolar y esta formada por una matriz de particulas esféricas de gel de sílice de 5 micras de tamaño medio a las que está ligada químicamente una fase estacionaria constituida por un hidrocarburo saturado de 18 atomos de carbono. Este tipo de columnas denominadas genéricamente como ODS (octadecasilsilica) debido a su composición fundamental,son usadas ampliamente y proporcionan una gran eficiencia , reproductibilidad y capacidad a las separaciones.

La mezcla de elución empleada,ha consistido basicamente en

mezclas de un disolvente de alta polaridad (metanol),con tampón acetato. Hemos elegido el metanol,debido a que no planteó grandes interferencias con el sistema fluorimétrico de detección y el hecho de presentar un coste mucho más bajo que algunos de los disolventes alternativos (acetonitrilo), o a la mayor facilidad de manejo con respecto a otros (Dioxáno, tetrahidrofuráno...etc). Hemos preferido el empleo de tampón acetato en lugar de otros tipos de tampones que sobre el papel presentan ventajas como el fosfato, etc, en cuanto a eficiencia de separación, con objeto de prevenir cristalizaciones en el interior de las canalizaciones del sistema analítico utilizado.

Con objeto de obtener un sistema de detección lo mas simple posible, hemos empleado un método de detección de tipo "pre-colúmna"que plantea sustanciales ventajas en lo referente a sencillez de utillaje necesario para su realización, facilidad de manipulación y repetibilidad del mismo. En este método se emplea un aldehído aromático (o-ptalaldehído), para la formación de un compuesto fluorescente con los aminoácidos y ha sido elegido frente a las posibles opciones (cloruro de dansilo, feniltiohidantoína, ect), debido a las mejores condiciones de reacción, posibilita una mayor uniformidad de respuesta.

Hemos utilizado un método de cuantificación con standar interno que era añadido a la muestra en cantidad conocida de forma previa a su análisis. Este método tiene la ventaja de

compensar totalmente los errores de medida de volumen que se producen tanto en la preparación de la muestra, como en la introducción de la misma en el interior de la columna,errores por otra parte muy probables debido a los pequeños volumenes de muestra que se utilizan en cromatografía y que de no ser compensados ó eliminados pueden alterar muy gravemente los resultados de la misma.

El standar interno utilizado ha sido el ácido cisteico,este compuesto se eluye por la columna al comienzo del análisis cromatográfico y no interfiere con ninguno de los aminoácidos presentes en las muestras.

Las gráficas concentración-respuesta de cada uno de los aminoácidos han sido establecidas para cada aminoácido y utilizadas en la cuantificación de las muestras problema, la linealidad de dicha respuesta establecida por el coeficiente de correlación lineal es altamente significativa hasta concentraciones 5 veces superiores a las fisiológicas (ver tabla V) la sensibilidad teórica que hemos determinado asi mismo mediante el uso de estas gráficas, es del orden del nM en las condiciones de trabajo elegidas con vista a obtener mediciones afectadas por un bajo ruido de fondo.

La precisión del método ha sido establecida mediante el cálculo del coeficiente de variación de medidas sucesivas de los aminoácidos de una misma muestra,(ver tabla IV) los resultados obtenidos son ampliamente aceptables y han sido te -

nidos en cuenta en el establecimiento de los valores de referencia de los aminoácidos plasmáticos. La exactitud no ha podido ser establecida debido a la no existencia de muestras -- patrón de aminoácidos de concentración conocida y medida por un método comparable al utilizado por nosotros.

La metodología utilizada para la elección de los sujetos en estudio y para la obtención de muestras que se recogen en el apartado correspondiente a material y métodos, ha sido diseñada teniendo en cuenta experiencias previas de las que se dedujo que para un análisis fiable es necesario utilizar muestras obtenidas recientemente o inmediatamente después de su descongelación a -40°C.

Como resumen de todo lo anteriormente citado podemos concluir que la técnica utilizada consigue resolver en un tiempo aproximado y no mayor de 45 minutos, mezclas biológicas de 18 aminoácidos proteinogenéticos con una precisión (establecida mediante el coeficiente de variación) del 9,5 %, y con sensibilidad mínima de 1 nM, estos resultados obtenidos utilizando un "pool" de sueros, mejoran a cualquiera de los obtenidos mediante métodos de cambio iónico y por supuesto a metodologías no cromatográficas de baja especificidad. Tiene la tecnología utilizada el inconveniente de no detectar aminoácidos en los que el grupo amino sea de tipo secundario debido a lo que no se pueden valorar la Prolina ni la Hidroxiprolina.

VII.3.- VALORES DE REFERENCIA DE AMINOACIDOS PLASMATICOS.

Hemos procedido como primer paso de nuestro planteamiento básico,a obtener los valores de referencia de los aminoácidos plasmáticos para la población normal de nuestro entorno estudiada con la metodología discutida, ya que aunque estos valores de referencia han sido establecidos en diversas ocasiones en su obtención se han utilizado criterios tecnológicos diferentes.

Tras de estudios preliminares en muestras obtenidas de voluntarios sometidos a distintos tipos de nutrición,resultados en los que no observamos diferencias significativas,seleccionamos los sujetos de estudio por grupos de edad y sexo y los clasificamos en función del peso,de la talla y de la superficie corporal de los mismos.(Tabla I).

Los niveles medios de aminoácidos de población general medidos en nuestras experiencias y los que figuran recogidos en la bibliografia son significativamente comparables ($r = 0.98$) sin embargo los ambitos de normalidad que hemos establecido (ver tablas VI a IX y grafica I) son mas estrechos.

Este resultado, que a nuestro juicio justifica el planteamiento de este trabajo, lo hemos interpretado como una consecuencia de la mayor precisión de método de medición empleado por nosotros.

VII.3.1 - RELACIONES ENTRE LOS AMINOACIDOS PLASMATICOS

El estudio de las diferencias entre los niveles plasmáticos de aminoácidos medidos en los diferentes grupos de población, plantea diversas peculiaridades que revisaremos a continuación,(ver tablas XV y XVI . En ellas puede observarse como los niveles totales de aminoácidos plasmáticos estan ligeramente mas elevados en varones que en mujeres de cualquier edad, encontrandose acentuada la diferencias significativas ($P > 0.001$) entre los aminoácidos totales medidos en las muestras de los grupos III y IV (hombres y mujeres mayores de 15 años y menores de 50 años). No obstante, si analizamos los niveles de cada uno de ellos se observa la aparición de marcadas diferencias ($P > 0.001$) tanto entre los niveles absolutos de determinados aminoácidos como en la evolución de los mismos a lo largo de la edad asi como en sus relaciones con el peso, la talla y la superficie corporal de los sujetos en estudio.

Es de constatar en primer lugar la marcada diferencia que existe entre los niveles de SER, GLN, ARG, TIR, TRP, MET y CIS , medidos en los grupos I y II (niños y niñas), aspecto este bastante sorprendente sobre todo si tenemos en cuenta la aparente igualdad metabólica y endocrina del organismo durante los periodos de edad considerados.

La aparición de la pubertad condiciona modificaciones muy patentes en los niveles de aminoácidos plasmáticos, así hemos establecido diferencias significativas ($P > 0.001$) entre las concentraciones de GLN,ARG,MET,VAL, ILE, LEU, y LYS. En general hemos constatado que la aparición de la pubertad condiciona un aumento de las concentraciones de los aminoácidos libres del plasma, (ARG , GLU, SER, GLN, ALA , PHE, TIR, TRP, MET) tablas XV y XVI.Estos aumentos son paralelos para hombres y mujeres en los aminoácidos no esenciales, pudiendose correlacionar con un alto grado de confianza, los niveles de la mayoría de los mismos entre homores y mujeres.Las relaciones entre los aminoácidos esenciales medidos en ambos sexos son escasamente relacionables entre sí, en la mayor parte de los casos , si bien hemos podido establecer un aumento de los niveles plasmáticos de los aminoácidos esenciales de cadena lineal en todos los grupos puberales estudidos con respecto a los integrados por niños. La diferencia mas patente que hemos podido detectar , se establece en los niveles de aminoácidos esenciales de cadena ramificada, para los que hemos comprobado una evolución opuesta en los grupos de hombres y mujeres puberales estudiados. Ya que, como está ampliamente demostrado , el metabolismo de estos aminoácidos tiene lugar fundamentalmente en la célula muscular; podemos concluir que la aparición de la pubertad condiciona la modificación de los niveles plamáticos de los aminoácidos rela -

cionados con el metabolismo protéico del músculo, de manera diferente para hombres y mujeres. Dado que la pubertad en ambos sexos está decisivamente influenciada por mecanismos de regulación endocrina (puestos,podría intuirse en estos resultados la existencia de algún mecanismo regulador mediado por hormonas gonadales que permitiera explicar el citado comportamiento.

Los niveles de aminoácidos plasmáticos medidos en los grupos V y VI (mujeres postpuberales y hombres mayores de 50 años), evolucionan de manera muy similar en ambos sexos para los aminoácidos no esenciales y esenciales de cadena lineal conservándose también en este caso la evolución opuesta para los de cadena ramificada. Además de las características citadas para la evolución de los aminoácidos medidos en sujetos pertenecientes a los grupos citados en último lugar, sus niveles presentan escasas diferencias entre ellos, pudiéndose establecer diferencias significativas solo para TRP, MET, VAL e ILE.

Pueden resumirse los párrafos anteriores,estableciendo que los niveles plasmáticos de aminoácidos aumentan en su mayor parte de manera paralela a la edad, el peso, la talla y la superficie corporal de los individuos estudiados como lo prueban los resultados que se recogen en la gráf(7) en la que se encuentran los coeficientes de correlación entre los citados parámetros. Son excepciones a este hecho los datos referentes a la evolución de los aminoácidos esenciales de

cadena ramificada que se comportan de forma opuesta y no comparable para ambos sexos, tanto en lo referente a las relaciones entre los mismos como a las existentes con los parámetros mediante los que hemos definido la evolución del crecimiento de las poblaciones estudiadas (edad, peso, talla y superficie corporal), y que son solo significativas para el sexo masculino. No es tampoco posible relacionar entre si a los niveles de los distintos aminoácidos medidos en los grupos de mujeres estudiados, este hecho incluye la imposibilidad de correlacionar entre si y con los aminoácidos GLN, GLU y ALA que son sus intermediarios metabólicos más importantes a los aminoácidos esenciales de cadena ramificada. Todos estos tipos de relaciones es posible establecerlas con un alto grado de significación entre los aminoácidos medidos en grupos de varones. Basados en estos hechos experimentales, planteamos aquí la idea de estudiar con mayor profundidad los mecanismos endocrinológicos que puedan mediar la regulación del metabolismo (muscular fundamentalmente) de los aminoácidos que hemos citado.

VII.4.- INFLUENCIA DEL STRESS INDUCIDO EN LOS NIVELES PLASMATICOS DE LOS AMINOACIDOS.

Ante los perfiles plasmáticos medidos, y dadas las supuestas influencias endocrino-metabólicas en el manteni-

miento de los mismos, nos planteamos su estudio desde el punto de vista de las alteraciones endocrinas que produce el stress físico en pacientes sometidos a patologías agudas.

Encontrándose establecido el hecho de que las alteraciones endocrinas fundamentales del stress están mediadas principalmente por los corticoides cuya secreción es estimulada por el aumento de producción de ACTH, su hormona trófica hipofisaria, para estudiar la influencia del stress en los niveles de aminoácidos plasmáticos,primero intentamos reproducirlo artificialmente en algunos de sus aspectos mediante la administración intravenosa de ACTH, iniciando así la respuesta hormonal consiguiente.

En nuestros estudios de simulación de un stress,obtuvimos solo un dato estadísticamente significativo (P > 0 001) que fuera un incremento en la concentración de Alanina a los treinta minutos de la administración de ACTH intravenoso, este incremento de alanina coincidía también con la mayor concentración de cortisol ; a los 60 minutos se produce un descenso en los niveles de estos tres componentes,para aproximadamente a las dos horas del inicio de la prueba estos valores regresan a niveles basales ; se detectó también una elevación paralela en la glucemia.

En los niveles de los aminoácidos de cadena ramificada se advirtió una ligera disminución (escasamente significativa) de sus niveles plasmáticos,hecho que suponemos es debido a la escasa duración e intensidad de la prueba.

No son,por otra parte,demostrables alteraciones en los niveles plasmáticos de los restantes aminoácidos tras la administración de ACTH en los que se incluye PHE y el indice PHE/TIR que reflejan la inexistencia de proteolisis secundaria al tratamiento empleado y que impiden relacionar esta proteolisis con la actuación de la gluconeogénesis planteada en el anterior párrafo

Esta interpretación puede ser confirmada por la correlación (altamente significativa) entre los niveles de GLN, ALA, VAL, ILE, y LEU y los de cortisol a lo largo del estímulo y al hecho de una mayor positividad para la ALA y GLN y negatividad para los restantes. Estas modificaciones pueden ser significativamente comparadas con los niveles de cortisol plasmáticos.

De lo anterior se deduce que la administración de ACTH induce aumentos inmediatos y muy significativos en los niveles de ALA acompañada de una disminución escasamente significativa para los aminoácidos esenciales de cadena ramificada y para la GLN,resultados que son interpretables desde el punto de vista de la potenciación de la gluconeogénesis unida a una hiperglicemia refractaria a la insulina que inducen los glucocorticoides y cuya magnitud es dependiente tanto del nivel como de la duración de las modificaciones en los niveles hormonales del plasma.

Menos claro en este planteamiento,está el dato experimen-

tal de las diferencias significativas que se establecen en los niveles de TRP, MET, y THR.

VII.5.- EFECTOS EN AMINOACIDOS PLASMATICOS DE SUJETOS EN ESTADO DE STRESS DEBIDO A UN TRAUMATISMO CRANEOENCEFALICO PURO.

En pacientes afectos de trauma muscular multiple (politraumatizados) se produce segun se recoge en bibliografía(56) un aumento en la proteólisis muscular y una mayor liberación de aminoácidos de cadena ramificada produciendose un aumento de sus niveles plasmáticos y una disminución paralela de los de alanina.Estos datos experimentales se explican claramente como resultado de la hiperglucemia refractaria a la insulina que se produce en individuos sometidos a stress metabólico y que estaria mediada por el aumento en la secreción de glucocorticoides y catecolaminas.Nuestros datos experimentales obtenidos de pacientes de T.C.E.,coinciden con los bibliográficos , en lo referente a aminoácidos de cadena ramificada, que se elevan asimismo en las horas inmediatas al trauma,pero difieren de ellos en lo referente a la evolución de los niveles de alanina,que en nuestro caso,se elevan.Este hecho podia estar mediado exclusivamente por un aumento muy significativo en la secreción de glucocorticoides que estaria precedido por una fuerte elevación de precursores.Estos supuestos estarian

confirmados por los resultados obtenidos del test de estímulo con ACTH efectuado a un grupo de voluntarios. En estos se puede detectar una discreta elevación de la alanina que no se corresponde con la hiperglucemia(que se mantiene prácticamente constante) y si con la de los aminoácidos de cadena ramificada. Segun los resultados de nuestros estudios en pacientes con T.C.E. se establece una diferencia notable en el perfil de los aminoácidos plasmáticos con respecto al que presentan los pacientes politraumatizados fundamentalmente en lo referente a la alanina.

VIII.- CONCLUSIONES.

1.- Hemos estudiado y puesto a punto un método de cromatografía líquida de alta presión, para determinar aminoácidos en líquidos biológicos en un tiempo total de 47 minutos y un C.V. de 9.5% .

2.- Mediante el método citado, hemos estudiado los valores de referencia de 16 aminoácidos en 6 grupos de voluntarios sanos,establecidos en función de la edad y el sexo. Los niveles de aminoácidos medidos por este método en una población normal,son comparables en líneas generales, a los citados en la bibliografía.

3.- Hemos encontrado que los niveles de LIS , ILE, VAL y LEU, entre grupos de diferente edad y sexo, se elevan en los varones y bajan en las mujeres.Las diferencias más marcadas se establecieron en la edad puberal, y están reflejadas en la evolución opuesta que siguen estos cuatro aminoácidos de cadena ramificada en los diferentes sexos.

4.- Dado que los aminoácidos ramificados son metabolizados fundamentalmente en el musculo,pensamos que las modificaciones observadas en la edad puberal estan relacionadas con las diferencias del metabolismo proteico del musculo en varones y hembras.

5.-El tratamiento con ACTH (25 U.I. iv) produce un aumento transitorio en los niveles de alanina en plasma,esta elevación se corresponde con una ligera disminución de los aminoácidos de cadena ramificada.

6.-En pacientes sometidos a stress metabólico debido a un traumatismo craneoencefálico puro,se ha demostrado experimentalmente una elevación importante de los niveles de alanina,que se desarrolla de forma paralela a una ligera disminución en los niveles de aminoácidos de cadena ramificada. Este perfil es comparable con el que puede establecerse tras la administración de ACTH i.v. y en pacientes politraumatizados.

IX.- BIBLIOGRAFIA

1.- McCoy,R.H.,Meyer,C.E.,and Rose,W.C.(1935):Feeding experiments with mixture of highly purified amino acids. VIII. isolation and identification of a new amino acids.J.Biol. Chem. 112:283-302.

2.- Rose,W.C.(1957): The amino acids requeriments of adult man. Nutr.Abstr.Rev. 27;631-647.

3.- Willcock,E.G.,and Hopkins,F.G.(1906): The importance of individual amino acids in metabolims;observatios on the effect of adding trytophan to dietary in which zein is the sole nitrogennous constituent. J.Physiol. (London) 35:88-102.

4.- Osborne,T.B.,and Mendel,L.B.(1914): Amino acids in nutrition and growth.J.Biol.Chem. 17:325-349.

5.- J.Manuel de Palacios Mateos, Endocrinologia y Metabolismo en la Practica Médica, 2ª ed., Ed. Paz Montalvo; 1977.

6.- Mattews,A.N.(1974): The nutritive significance of the amino acids.Physiol.Rev. 18:109-136.

7.- Munro,H.N.(1964): An introduction to biochemical aspects of protein metabolims In: Mamalian Protein Metabolims,

(eds: H.N. Munro and J.B. Allison) Vol.I,pp. 31-34 Academic Press,New York

8.- Munro,H.N.and Crim,M.C. (1980): The proteins and amino acids. In: Modern Nutrition in Health and disease (eds.R. S. Goodhart and M.E. Shils).Sixth Ed.,pp. 51-90. Lea and Febiger,Philadelphia.

9.- Miller,L.L.,(1962):The role of the liver and the nonhepatic tissues in the regulation of free amino acids levels in the blood. In: Amino Acids Poole (ed. J.T.Holden) pp. 709-721,Elsevier,Amsterdam.

10.-Young,V.R.,and Munro,H.N.(1973): Plasma and tissues Tryptophan levels in relation to tryptophan requeriments of weanling and adult rats:J.Nutr.103:1756-1763.

11.- Wahren,J., Felig,P.,and Hagenfeldt,J. (1976): Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and diabetes mellitus. J.Clin.Invest. 57:973-999.

12.- Goldberg,A.L.,Odessey,R.,(1973): Exploratory concepts in muscular distrophi.Ed.A.T.Milhovat.Excepta Medicine Vol. II.pp.187-199.

13.- Young,V.R.,(1970): Mammalian protein metabolism. Ed H.H. Munro. New York. Academic Ress. Vol IV,pp.485-674.

14.- Miller,L.L.(1965): Amino acids pools. Ed. J. T. Holden, Amsterdam,Elsevier pp 708-721.

15.- Odessey,R.,Park,B.,(1982): Effect of insuline and leucine on protein tournover in rats soleus muscle after burn injury.Metabolism,31-1.

16.- Munro,H.N.,Black,J.G.,and Thomson,W.S.T.(1959): The mode of action of dietary carbohydrate on protein metabolims. Brit.J.Nutr. 13:475-485.

17.- Munro,H.N.,and Thomson,W.S.T.(1953): Influence of glucose on amino acid metabolims.Metabolism 2:354-358.

18.- Tischler, M. E., Fagan,J.M.(1975): Response to trauma of protein amino acids, and carbohydrate metabolism in injured rat skeletal muscle. The Journal and clinical invest.,56 1250-1261.

19.- Motil,K.J.,et col.,(1981):Whole body leucine and lysine-metabolism studied simultaneously with leucine and lysine: response to altered dietary protein intake in young

men. Amer.J.Physiol.240,E712.

20.- Elia,M.and Livesey,G.(1981): Branched-chain amino acid and oxo acid metabolism in human and rat muscle. In: Metabolism and Clinical Implications of Branched-Chain Amino and Keto Acids (eds M. Walser and J.R. Williamson), pp. 257-262, Elsevier/North Holland,New York.

21.- Felig,P. (1973): The glucose-alanine cycle. Metabolism 22:179-207.

22.- Felig,P.(1981):Inter-organ amino acid exchange,In:Nitrogen Metabolism in Man.(eds.J.C. Waterlow and J.M.L. Stephen),pp.45-61,Appl Sci.Publ./London.

23.- Schrock,H.,and Goldstein,L.(1981): Interorgan relationships for glutamine metabolism in normal and acidotic rats. Amer. J.Physiol.240:E519-E525.

24.- Long,L.L.,(1981): Urinary excretor of 3-methyl-histidine an assesement of muscle protein catabolism in adult normal subjets and during malnutrition. Metabolism 30,8.

25.- Hussein,M.A.,Young,V.R.,Murray,E.,and et al.(1971):Daily fluctuation of plasma amino acids levels in adult men: Effect of dietary tryptophan intake and distribu

tion of meals. J.Nutr. 101:61-70.

26.- Young,V.R.,Svrimshaw,N.S.(1978): Nutritional evaluation of proteins and protein requeriments.In Protein Resources and Technology (eds:Milner,M.;Scrimshaw,N.S.) pp. 136-173 Westport,Connecticut,AVI Co.,Inc.

27.- Fernstrom,J.D.,Wurtman,R.J.,Hammerstraun-Wiklund,B., et al (1979): Diurnal variations in plasma neural amino acid concentrations among patients with cirrhosis: effect of dietary protein. Am.J.Clin.Nutr. 33:1923-1930.

28.- Garlick,P.J.;Clugston,G.A.,Swick,R.W.,and et al (1980): Diurnal pattern of protein and energy matabolism in man.Am.J. Clin.Nutr. 33:1983-1986.

29.- Glugston,G.A.,Garlick,P.J.(1982): The response of protein and energy metabolism to food intake in lean and obese men.Human Nutr.Clin.Nutr. 36C:57-70.

30.- Martin du Pan, R., Mauron,C.,Glaesser.(1982): Effects of various oral glucose doses on plasma neutral amino acids Metabolism 31:9.

31 - Young,V.R.,Taylor,Y.S.M.,Rand,W.M.,(1973): Protein requeriments of man:Efficiency of egg protein utilization at maintenance and submaintenance levels in young men. J.Nutr. 103:1164-1174.

32a.- Inoue,G.,Fujita,Y.,Kishi,K.,and et al.(1974): Nutritive values of egg protein and wheat gluten in yuong men. Nutr.Rept.Intl. 10:201-207.

32b.- Hegsted,D.M.(1976):Balances studies.J.Nutr.106:307-311.

32c.- Waterlow, J. C., Garlick, P. J.,Millward,D.J.,and et al (1977): Protein tournover in mammalian tissues and in the whole body,p.804. Elsiever/North Holland Amsterdam and New York.

32f.- Matthews, D. E., Motil, K. J.,Rohrbaugh,D.K.,and et al. (1980): Measurements of leucine metabolism in man from a primed continuous infusion of leucine. Am.J. Physiol. 238:E437-E479.

32e.- Motil, K. J., Matthews,D.E.,Bier,D.M.,and et al(1981a): Whole body leucine and lysine metabolism:response to dietary protein intake in young men. Am.J.Physiol. 240:E712-E721.

32h.- Garza,, C., Scrimshaw,N.S.,Young,V.R.,and et al (1976): Human protein requeriments:the effects of variations in energy intake within the maintenance range. Am.J. Clin Nutr. 29:280-287.

33.- Wilmore,D. W. (1974): Anabolic effects and human growth hormone and high caloric feedings following termal injury. Surg Gynecol Obstet. 139:875-884.

34.- Goldberg,A L.,(1980): Hormone regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. Fed. Proc.39. 31-36.

35.- Sharmon, H.V., Sonan,R.S.,Shorwin,.(1980): The influence of acute physiological increments of cortisol or fuel metabolism and insulin binding to monocite in normal humans.J.Clinical.Endo.Metabolism 50:495-501.

36.- Leatham,J.H.(1964): Some aspects of hormone and protein metabolic interrelationships.In Munro,H.N.,and Allison, J.B. (Eds.):Mammalian Protein Metabolism,New York:Academic Press, Inc.,pp.343-380.

37.- Kochakian,C.D., and Murlin,J.R.,(1935): The effect of male hormone on the protein and energy metabolism of

the castrate dog. J.Nutr. 10:437-459.

38 .- Barlett,P.D.(1953): Rates of protein synthesis,amino acid catabolism and size of nitrogen pool during nitrogen storage induced with testosterone propionate and testosterone prionate combined with growth hormone. Endocrinology 52:272-276.

39 .- Frieden,E.M., Cohen,E.H., and Harper,A.A.,(1961): The effects of steriod hormones upon amino acid incorporation into mouse kidney homogenates. Endocrinology. 68:862-866.

40 .- Kassenaar,A.,Kouwenhoven,A.,(1962): On metabolis action of testosterona and related compounds:V. the effects of testosterone on the nucleic acid composition of seminal vesicles and kidneys of mice. Acta Endocr. 39:223-233.

41 .- Wilson,J.D.,(1962): Localization of the biochemical site of action of testosterone on protein systhesis in the seminal vesicles of the rat. J.Clin.Invest. 41:153-161.

42 .- Roberts,E.,and Simonsen,D.,(1962): Free amino acids in animal tissues. In Holden,J.T.(ed.): Amino Acid Pools, Amsterdam: Elsevier Publishing Co.,pp.284-349.

43 .- Ackermann,P.G.,and Kheim,T.,(1964): The effects of testosterone on plasma amino acid levels in Elderly Individuals. J.Geront. 19:207-210.

44 .- Christensen,H.N.,and Streicher,J.A.(1948): Association Between rapid growth and elevated cell concentrations of amino acids: I. IN fetal tissues J. Biol Chem. 175:95-100.

45 .- Christensen,H.N.,et al(1958): Association Between rapid growth and elevated concentrations of amino acids:II In regenerative liver after partial hepatectomy in the rat. J.Biol.Chem 175:101-105.

46 .- Wurtman,R.J.,Chou,C.,and Rose,C.M.,(1967): Daily rhythm in tyrosine concentration in human plasma:persistence on low-protein diet. Science 158:660-662.

47 .- Wurtman,R.J.,Rose,C.,Rose,L.,et al (1968): Diurnal amino acid rhythm in endocrine disease. Clin.Research 16:355-361.

48 .- Halberg,F.,and et al.(1959): The term circadian.Z.Vitamin, Hormon Fermeniforsch.,10:255-261.

49 .- Mills,J.N.,and et al.(1966):Circadian rhythms in numan.. Physiol.Rev.,46:128-135.

50 .- Feigen, R. D.,and et al.(1967): Diurnal periodicity of whole blood amino acids in man. Special report to the comission of epidimiological Survey,Washington D.C.

51 .- Mallison, C. N.,Bloom,S.R.,Warin,A.P.,and et al;(1974): Glucagonoma syndrome. Lancet II:1-5.

52 .- Boden, G., Owen, O.E.,Rezvani,B.I.(1977): An islet cell carcinoma containing glucagon and insulin. Diabetes 26:128-137.

53 .- Boden,G., Master, R.W.,Rezvani,I.(1980): Glucagon deficiency and hyperaminoacidemia after total pancreatectomy. J.Clin.Invest. 65:706-716.

54 .- Muller,W.A.,Berger,M.,Suter,P.,(1979): Glucagon immunoreactivities and amino acid profile in plasma of duodenopancreactectomized patients. J. Clin. Invest. 63:820-827.

55 .- Bode,G.,Rezvani,I.Owen,O.E.(1984): Effects of glucagon on plasma amino acids. J.Clin.Invest. 73:785-793.

56.- Oliver,J.R.,and Wagle,S.R.,(1975): Studies on the inhibition of insulin release,glucogenolysis and gluconeogenesis of somatostatin in the rat islets of langherans and isolated hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62:772-777.

57.- Sacks,H.,Waligora,K.,Matthews,J.,(1977): Inhibition by somatostatin of glucagon induced glucose release from the isolated perfused rat liver. Endocrinology. 101: 1751-1759.

58.- Shenkin,A.,Neuhause,M.,and Bergstrom,J.(1980): Biochemical changes associated with severe trauma. Am.J.Clin. Nutr. 33:2219-2127.

59.- Whitehead,R.G.,and Dean,E.A.(1964): Serum amino acids in kwashiorkor.Relatioship to clinical condition. Am.J.Clin Nutr 14:313-319.

60.- Padilla,R., Sanchez,A., Powell,C. (1971): Plasma amino acids in children fron Guadalajara with kwashiorkor. Am. J.Clin.Nutr. 24:358-362.

61.- Waterlow,J.C.,and Harper,A.E.(1975): Assessment of pro-

tein nutrition. ed. Ghadimi,H. New York:Wiley pp.1975-1984.

62.- Woolf,L.A.,Groves,J.P.,Moore,J.H.,et al.(1976): Arterial plasma amino acids in patients with serious postoperative infection and in patients with major fractures. Surgery 79:283-294.

63.- Wannemacher, R. W., Klainer, A. S. ,Dinterman,R.E.,et al. (1976): The significance and mechanism of an increased serum phenylalaninetyrosine ratio during infection. Am J. Clin .Nutr. 29:997-1009.

64.- Kinney,J.M., Duke,J.H., Long,C.L., et al,(1970): Carbohydrate and nitrogen metabolism after injury. J.Clin. Pathol. 23:65-72.

65.- O'Keefe,S.J.,Sender,P.M.,and James,W.P.,(1974): "Catabolic" loss of body nitrogen in respose to surgery. Lancet 2:1035-1042.

66.- Williamson,D.H.,Farrell,R.,Kerr,A.,et al.(1977): Muscle protein catabolism after injury in man as measured by urinary excretion of 3-methylhistidine. Clin. Sci. Mol. Med. 52:527-533.

67.- Adibi,S.A.,(1976): Metabolism of branched-chain amino acids in altered nutrition.Metabolism 25:1287-1302.

68.- Buse,M.G.,and Reid,S.S.,(1975): Leucine:a possible regulator of protein turnover in muscle. J.Clin.Invest. 56: 1250-1255.

69.- Williamsom,J.H.,and Walser (eds.)(1981): Metabolism and Clinical Implications of Branched-Chain Amino and Keto acids. Elsevier/North Holland.New York.

70.- Smith, M.E. (1974): Labelling of lipids by radioactive amino acids in the central nervous system. J.Neurochem. 23:435-444.

71.- Wedge,J.H.,De Campos,R.,Kerr,A. et al.(1977): Branched-chain amino acids nitrogen excretion and injury in man. Clin. Sci. Mol. Med. 50:393-417.

72.- Elia,M.,Farrell, R.K.,Ilic, V.,et al (1980): Removal of infused leucine after injury,starvation and other conditions in man. Clin.Sci. 59:275-283.

73.- Adibi, S.A., and Drash, A.L.,(1970): Hormone and amino

acids levels in altered nutritional states. J.Lab. Clin. Med. 76:722-732.

74.- Adibi,S.A.,Klemencic,J.,and Phillips,E., (1969): Metabolism of branched-chain amino acids in starvation. Clin. Res. 17:376-386.

75.- Milner,R.D.G.,(1969): Stimulation of insulin secretion in vitro by essential amino acids. Lancet 1:1075-1087.

76.- Pozefsky,T.,Felig,P.,Tobin,J.D.,et al(1969): Amino acids balances across tissues of the forearm in postabsortive man. Effects of insuline at two dose levels. J. Clin. Invest. 48: 2273-2285.

77.- Akedo,H.,and Christensen,H.N.,(1962): Nature of insulin action on amino acid uptake by the isolated diaphram. J. Biol Chem. 237:118-129.

78.- Wool,I.C.,Scharff,R.,(1968): Effect of insulin and diabetes on amino acids trasnport in muscle. In: Leathem, J.H. Ed.:Protein nutrition and free amino acid patterns, New Brunswick, Rutgers University Press, pp.157-169.

79.- Schimassek,H.,and Gerok,W.,(1965): Control on the levels of free amino acids in plasma by the liver. Biochem.Z. 343:407-417.

80.- Mallete,L.E.,Exton,J.H.and Park,C.R.,(1969): Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. J.Biol.Chem. 244:5713-5729.

81.- Felig,P.,Marliss,E.,and Cahill,G.F.,(1969): Plasmd amino acids levels and insulin secretion in obesity. New Eng. J.Med. 281:811-829.

82.- Cahill,G.F.,Herrera,H.,Morgan,A.P.,et al.(1966): Hormone fuel interrelationship during fasting. J. Clin. Inves. 45;1751-1764.

83.- Solomon,S.S.Ensinck,J.W.,and Williams,R.B.(1968): Effect of starvation on plasma immunoreactive insulin and nonsuppreessible insulin-like activity in normal and obese humans. Metabolism 17:528-541.

84.- Beck,P.,Koumans,J.H.T.,Winterling,C.A.,et al,(1964):Studies of insulin and growth hormone secretion in human obesity. J.Lab.Clin.Med. 64: 654-673.

85.- Kekwick,A.,Pawan,G.L.S.,and Chalmers,T.M. (1959): Resistance to ketosis in obese subjects. Lancet 2:1157-1159.

86.- Flear,C.I.G.,(1974): Intravenous feeding (letter to the

eds.). Lancet april.

87 .- Schmahl,J.,(1973):In neurotraumatologie.Ann.Anest.Francaise special 1.

88 .- McLaurin, R. L.(1975): Metabolic effets of head injury. Handbook of clinical neurology. Vol.23. Eds.by P.J. Vinken and G.W.Bruyn. American Elsevier Publishing. Co. New York.

89 .- Porte,D.,(1966): The effects of epinephrine on immunoreactive insulin levels in man. J.Clin.Invest. 45:228-231.

90 .- Selye, H., (1936): A Syndrome produced by diverses noxious agents.Nature 128:32-45.

91 .- Ingle,D.S.,(1954): Permisive action of hormones. J.Cli. Endocrinol.Metabol. 14:1272-1286.

92 .- Lee, H., (1974): Parenteral nutrition in acute metaboic illness. London,Academic Press Inc.

93 .- Yates,F.E.,Urgnhart,J.,(1962): Control of plasma concentration of adrenocortical hormones. Physiol. 42:359.

94 .- Fossatti,P.,(1968): Manifestations endocrino-metaboli-

ques de l'agresion cerebrale.Acta Anaesth.Belga 19:284.

95 .- Bouzarth,W.F.,(1968):Adrenocortical response to cranio-cerebral trauma. Surgery Gynec.Obstet. 126:995.

96 .- Fossati, P., (1973): La function hypophyso-corcicotrope du traumatisme cranien. Special 1. Neurotraumatologie Ann. Anest.Francaise. pp.65.

97 .- Wise,B.L.,(1962): Failure of hindbrain,to depress ACTH secretion in dogs with isolated pituitaries. Fed. Amer. Sur. Exp.Biol. 21:196.

98 .- Stoner,H.B.,(1970): Energy metabolism after injury (pp. 47-55) in "The patology of trauma".Eds. S.Sevitt,and H. B. Stoner.London.

99 .- Wannemacker, R. W., (1975): Protein metabolism (Applied biochemistry) pp. 85-133 in "Total parenteral nutrition premises and promises" Edited by H.Shadimi, J. Whiley. London.

100.-Fleck,A.,and Munroe,H.N.,(1963): Protein metabolism after injury. Metabolism. 12:783-795.

101.-Blackburn, G. L., Flatt,J.P., Clowes,G.H.A. Jr., et al. (1973): Pheripheral intravenus feeding with amino acid solutions. Am.J.Surg. 125:447-457.

102.-Studley,H.O.(1936): A basic indicator of surgical risk. J.A.M.A. 106:458-467.

103.-Long,C.L.,Spencer,J.L.,Kinney,J.M.,et al (1971):Carbohydrate metabolism in man. Effect of elective operations a major imjury. J. App. Physiol. 31:110-119.

104.-O'Donnell,T.F., Clowes,G.H.A. Jr., Blackburn,G.L., et al (1974): Relationship of hind limb energy fuel metabolism to the circulatory responses in severe sepsis. J. Surg. Res. 16:112-121.

105.-Odessey,R.,and Glogberg,A.L.(1972): Oxidation of leucine by rat skeletecal muscle. Am.J.Physiol. 233:1376-1385.

106.-Odessey,R., Khairallah,E.A. and Goldberg, A. L. (1974): Origen and possible significance of alanine production by skeletecal muscle. J.Biol.Chem. 248:7623-7633.

107.-Clowes, G. H. A., Jr.,O'Donnell,T.F.,Jr.,Ryan,N.T. et al (1974): Energy metabolism in sepsis treatmant based on different patterns in shock and high output state. Ann.

Surg. 175:684-693.

108.-Blackburn,G.L.,Rutten,P.,Flatt,J.P.,et al.(1974): Muscle synthesis os nonessential amino acid during acute renal failure intravenous feeding. Int. Conf. Parenteral Nutrition Montpellier,France.

109.-Flatt,J.P.,and Blackburn,G.L.,(1974): The metabolic fuel regulatory system:implication for protein-sparing therapies during caloric deprivation and disease. Am.J.Clin. Nutr. 27:175-189.

110.-Garber,A.J., Menzel,P.H., Boden,G.,et al.(1974): Hepatic Ketogenesis and gluconeogenesis in humans.J.Clin.Invest. 54:981-988.

111.-Imamura,M., and Clowes,G.H.A.,Jr.,(1975): Hepatic blood flow and oxigen consuption in starvation,sepsis,and septic shock. Surg. Gynetol.Obstet. 38:142-149.

112.-Rubin,J.W.,and Clowes,G.H.A.,Jr.,(1969): Cardiovascular stresses in surgery. Surg.Clin.North.Am. 49:489-496.

113.-Askanazi,J.,Elwyn,D.H.,Kinney, J.M.,Gump,F.E.(1978):Muscle and plasma amino acids after injury: The role of inactivity. Ann. Surg. 188:797-803.

114.-Dolp,R.,Annefeld,F.W.,Grunert,A., (1976): Clinical studies on free amino acid concentration in plasma development of an amino acid pattern for parenteral nutrition during stress metabolism. Department Anesthesiology,Uni. Ulm West Germany.

115.-Elia, M.,Farrell,R.,Ilic,V.,Smith,R.,and Williamson,D.H. (1980): The removal of infused leucine after injury, starvation and other conditions in man. Clin. Sci. 59:279-283.

116.-Herndon,D.N.,Wilmore,D.W.,Mason,A.D.Jr.,and Pruitt,B. A. Jr.,(1978): Abnormalities of phenilalnine and tyrosine kinetics: Significance in setic and nonseptic burned patients. Arch. Surg. 113:133-135.

117.- Tietz,N. W.,(1972): Quimica clinica moderna. Primera edicion Interamericana S.A. Mejico.

118.- Frame,E. G., Wilhelmi,A. E.,(1943): Colorimetric estn of amino in blood.J.Biol.Chem. 149:225-234.

119.- Goodwin,J.F., (1968): Measurement of urinary amino nitrogen with 1-fluoro-2-4 dinitrobenzene. Clin. Chem 21:231-238.

120.- Googwin, J. F.,(1959): Simultaneous automatic detection of serum albumin and totel protein. Clin.Chem. 14:1080-1086.

121.- Henry, R. J., (1964): Clinical Chemistry:Principles and technics. II ed. Harper pub. Maryland.

122.- Pope, C. G., Stevens,M., (1939): Screening for elevated serum phenylalanine levels by a chromatographic method. J.Biochem 33:1070-1074.

123.- Matsushitas, S., Iwami, N.,Mitta,Y (1966): Variation of the free amino acids contents in soybeans,beaus pupkins and cucumbers during the ir ripeng ing period. Anal Biochem. 16:365-37.

124.- Underfriend S.,Cooper,J.R.,(1953): Assy of l-Phenylalanine as phenyletnylamine after enzimic decarboxyiation, isotopic studies. J.Biol.Med. 203:953-959.

125.- La Roy, E.C.,(1967): Modified procedour for radioactive hydroxyproline assay in urine and tissues after labeler proline administration. Adv. in Clin. Chem. 10:213-224.

126.- Mc Canan, M., Robin,E.,(1962): Fluorimetric method for

the detection of phenylalanine in serum.J Lab Clin Med 59:885-894.

127.- Ambrose, J. A.,Ros,C.,Whitfield,F.,(1967): Study of the fluorimetric method for phenylalanine in serum samples Technicon simponia, Vol 1,Ed:M.B.Scova, New York.

128.- Hill J.B.,Summer,G.K.,Pender,M.M.(1965): Autometed procedure for blood phenylalanine. Clin Chem. 11:541-548.

129.- Brown, P. R.,Krstulovial,A.M.,(1979): Reactical aspects of HP LC. Appl. Biochem. Biomed.Research. Anal.Biochem 99:1-6.

130.- Cannon, D. C., Winkelman, I.,(1974): Clinical chemistry principles and technics. II edc. Harper,R.

131.- Fernandez, A. (1965): Detection of cystine and cysteine its application to urine. Anal.Biochem. 11:190-198.

132.- Rosenthal, A. F., Yaseam,A.(1969): Improved qualitative screening test for cystinuria and homocystinuria Clin Chem. Ac. 26:363-371.

133.- Underfriends, S.,Cooper,J.R.,(1967): Enzymic conversion of phenylalanine of tyrosine and tyramine J.Biol.Chem.

196:227-234.

134.- Waalkes,T.P.,Underfriends,S.,(1957): Serotonin and histamine release during anaphilasis.J.Lab.Clin.Methodos 59:110-118.

135.- Yeh,H.,(1947): The urinary excretor of amino acids by a ciptinurie subjet amer. J.Med.Sein. 214:507-512.

136.- Guthrie, R.,Susi,A.,(1963): A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 32:338-343.

137.- Guirard, B. M.,Smell,E.S.,(1981): Biochemial factors in growsth in menual methods for general bacteriology. Am Soc. Microbiol. Washington D.C.

138.- Heathcote, J. G.,Davres,D M.,(1971): Improved technique for the analysis of amino acids and related componeds ou thin layers of cellulose IV.Quantitative determination of amino acids in urine. J.Chroma. 55:377-381.

139.- Becker,W.,(1958): Inmunologic determination of proteins fomd the low concentrations in human serum. Chim.Chem 15:649-654.

140.- Efrom, M. L.,(1968): High voltage peper electrophoresis in smith,Chromatographie II,edc. Vol II.Intercience,New York

141.- Cawley, L. P., et al.(1967): Myocardial infaction heart proteins,incuding enzymes in serum following myocardial infaction. Am.J.Clin.Phatol. 48:405-411.

142.- Singer,K.,(1966): Screening for elevated serum phenyil-alanine levels by a chromatografic method. An.J.Clin. Phatol. 45:647-654.

143.- Berry,H.K.,Poncet,B.,(1970): Plasma amino acids. Clin. Chim. Ac. 29:83-94.

144.- Mc Evoy,Bows,E.,Thovis,S.(1966): Detection of amino acids in 0.1 ml. of blood plasma. Clin.Chem. 12:144-149.

145.- Laster,L.,et al (1968): Transulphuration in manmels fetal and early development of methionine activating enzyme and its relation to hormonal influences. J.Med. 278:1253-1259.

146.- Rokkones,T.,(1964): Thi Layers chromatographi of amino acids in urine. J.Clin.Lab.Inves. 16:149-153.

147.- Jorgensem,O.,Kofod,B.,Rafael,S.,(1970): Amino acids excretion in urine of normal. Chim.Chem. 17:161-168.

148.- Hormimg, E. C.,Hormimg,M.C.,Herman,T.,(1971): Metabolic profiles obtained. Eds:G.C.and G.C.N.C. J.Chroze S.C., 35:129-135.

149.- Jellen,E.,Stokke,O.,Eldjar,L.,((1972): Combined use of GG:M.S. and computer in diagnistic and studies of metabolic desorders. Chim.Chem.,18:1800-1811.

150.- Moore,S.,Stein,W.H.,(1954): Procedurs for the chromatografyc determination of amino acids ou four percent errors linked sulfone ted eoliestirene revins. J. Biol. Chem. 211)893-899.

151.- Moore, S., Spackmen,D.H.,Steinw,H.,(1958): Chromatographyc of amino acids ou sulfonated. Re.Anali.Chem., 30:1185-1191.

152.- Shihs, V., Efrom,M.L.,Mechenic,G.L.,(1967): Rapid short colunm* thromatorphy of amino acids.A method for blood and urine specimens in the diagnostic and treaturent of metabolic diseaus..Anali.Biochem.,20:299-311.

153.- Scriber, C. R.,Davis,E.,Lamin,P.,(1968): Accelered ted selective short columm.chromatography of neutral amino acids ou Beckman spirico analysis of two. sangre. Clin. Biochem., 1:179-184.

154.- Grumble, R. F.,Whitehead,R.;(1971): Au autometed method for rapid chromatographyc alanine and glycine. Clim. Chim.Act. 31:355-359.

155.- Horvath,C.,Melander,W.,Molnar,P.,(1977): Liquid chromatography of ionic substances with nonpolar stationary phases. Anal.Chem. 49:2295-2301.

156.- Horvath,C.,Melander,W.Molnar,L.,(1976): Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. J.Chomatography 125:129-134.

157.- Dickinson, J.,Hamilton,P.,(1966): Biochemical analysis. Anal.Chem 13:1179-1184.

158.- Collin, H., Guiochon, G.,(1977): Development and use of carbon absorbent in high performance liquid solid chromatography.I.Carbon coated silice particles.J.Chromatography 141:289-294.

159.- Zimmerman,C.L.,Apelle,E.,Pisano,J.,(1977):Rapind analysis of amino acids phenylhydantoins by HPLC. Anal.

Biochem. 77:569-573.

160.- Simmons, S. S.,Sohson,D.F.,(1976): The structure of the fluorescent addud formed in the reaction of o-phtaldehido and tiols with amines. J.Anal.Chem. 98:7098-8004.

161.- Knox,J.H.,Liard,J.C.,(1976): Soap-chromatography a new nigh perfomance liquid chromatography technique for separation of ionizable materials Dye intermediates. J. Chromatography 122:12-19.

162.- Murok, D., Beretto,H.P.,Munessar,S.,(1980): Disociation constant of acetic acid and primary phosphate ion and standers for pH in 10.20 and 40 wt% ethanol, water solvent and 25, 0, -5 and -10 C. Anal.Chem 53:145-152.

163.- Meek, J.L.,(1980): Normogram for adjusticy mobile phase composition in reverse phase nigh presure L-c. Anal. Chem. 52:1370-1374.

164.- Murok, D., Richard, M., (1991): Precdiction of optium solvent composition for thin lager chromatography.Anal. Chem. 53:563-568.

165.- Marvin,D.,Stave,U.,(1973): A study of plasma free amino acid levels. I. Study of factors affecting validity of amino acid analyses. Metabolism 22:549-560.

166.- Lopez Lachero,M.,(1981):Fundamentos y métodos de estadistica. Eds. Piramide.

167.- Rios,S.,(1977): Análisis estadistico aplicado. Eds. Paraninfo.

168.- Ruiz-Maya,L.,(1977): Métodos estadisticos de investigación social;introducción al análisis de la varianza Eds;I.N.E. Madrid.

169.- Tejedor, F. J.,(1984) :Análisis de la varianza aplicado a la investigación. Eds; Anaya II.