



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA



**NIVELES SÉRICOS DE ARGININA Y CITRULINA EN NEONATOS DEL
INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES
I.A.H.U.L.A.: A TRAVÉS DE UN ESTUDIO COMPARATIVO**

bdigital.ula.ve

AUTORES:

Contreras Mike

C.I: 19.597.599

Gallardo María

C.I: 20.099.18

TUTOR:

Lic. Iraima D'Jesus

C.I: 9.476.234

Enero 2015



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA



**NIVELES SÉRICOS DE ARGININA Y CITRULINA EN NEONATOS DEL
INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES
I.A.H.U.L.A: A TRAVÉS DE UN ESTUDIO COMPARATIVO**

Trabajo Especial de Grado como requisito para optar al título de licenciado en
Nutrición y Dietética

AUTORES:

Contreras Mike

C.I: 19.597.599

Gallardo María

C.I: 20.099.182

TUTOR:

Lic. Iraima D'Jesus

C.I: 9.476.234

Enero 2015

DEDICATORIA

Hoy se cumple una de nuestras más anheladas metas, la cual nos llena de mucha felicidad al alcanzar tan importante logro para nosotros y en especial se lo dedicamos:

A Dios todopoderoso, por iluminarnos en el sendero de la vida y a lo largo de nuestra carrera, el principal espectador de nuestras acciones.

A la Universidad de Los Andes, por ser nuestra casa de estudio y darnos la oportunidad de cumplir esta meta y de crecer como personas.

A nuestros padres, por brindarnos apoyo y creer en nosotros.

A nuestros hermanos (as), para que les sirva de ejemplo y guía en las metas que quieran alcanzar.

A todos los recién nacidos que participaron en este estudio de investigación y que son nuestra inspiración.

LOS AUTORES

AGRADECIMIENTOS

Es hermoso alcanzar una meta cuando se ha luchado tanto por conseguir y más aún cuando contamos con personas a nuestro lado, dándonos ánimo y fuerzas para llegar a donde estamos hoy, especialmente:

A Dios todopoderoso, fuente infinita de sabiduría y amor, que nos ayuda siempre en todo momento.

A nuestra casa de estudio la Universidad de los Andes, por habernos dado la oportunidad de formarnos como profesionales y brindarnos tantos momentos que quedarán marcados en nuestras memorias.

A nuestros padres Elio Gallardo, Dilvia Blanco, Iris Colmenares y Miguel Contreras, que con mucho esfuerzos y perseverancia siempre quisieron lo mejor para nosotros, por sus grandes sacrificios y lucha, por habernos dado su apoyo espiritual, moral y económico hasta lograr colocarnos en el sendero de la vida, donde hoy hemos alcanzado con mucho éxito; a ustedes les dedicamos hoy y siempre nuestros logros.

A nuestros hermanos(as) Enmanuel Jesús, Gabriela Gallardo, Graciela Gallardo y Karla Gallardo quienes con cariño, comprensión, solidaridad, confianza y apoyo incondicional han sido ejemplo de superación y estímulo a seguir para lograr esta meta; de igual manera que sirva de ejemplo a los que van en el camino de lograr que sus sueños se hagan realidad.

Al Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes del Estado Mérida en especial al servicio de Neonatología “Dr. José D’ Jesús Avendaño” a la Dra. Belquis Rujano y las residentes de pediatría, al servicio de Sala de Parto y a las doctoras María Alejandra Sosa y Andrea Cardozo que permitieron trabajar con los recién nacidos de los mismos servicios.

Al Laboratorio General y al Laboratorio de Emergencias ambos del IAHULA; gracias por su colaboración en la obtención de las muestras biológicas a estudiar de los neonatos; en especial al Licenciado Cesar Paredes y a la Licenciada Liliana.

Muy especialmente al Dr. Luis Francisco Hernández por habernos permitido realizar este trabajo en el Laboratorio de Fisiología de la conducta “Eduardo Briese” de la Facultad de Medicina, por enseñarnos todo lo necesario para la realización del mismo, por habernos alentado en los momentos de crisis y por habernos enseñado que la paciencia y dedicación significan éxito; y que en el compartir está el avance de todos como personas y como científicos. Así mismo a la Licenciada Isbery Perez quien labora en el Instituto Nacional de Nutrición que nos canalizó al maravilloso mundo de la investigación y nos logró enlazar al laboratorio de fisiología de la conducta.

Al taller de Meridialisis C.A, Al Ingeniero Luis Ernesto Hernández y al Dr. Luis Betancourt, quienes nos ofrecieron su ayuda en cada día de trabajo a través de sus conocimientos, enseñanzas y experiencias; les agradecemos muchísimo.

En el laboratorio a las tesoristas de la carrera de biología Elismar Ruiz y Astrid Dávila quienes nos ofrecieron su amistad, apoyo y ayuda en los momentos más duros del progreso de la investigación. Es más que un agradecimiento lo que les ofrecemos.

A nuestros profesores, quienes con sus experiencias y sabiduría sirvieron de guía, en especial a la profesora Iraima D'jesus nuestra tutora académica por su inagotable ayuda, bondad y cariño.

A nuestros queridos amigos: Yolismar Arismendi, Adaelí Lázaro, Erwin Romero, Edilyn Lárez, Maridee Calderón, Leída Beleño, Yusimar Sosa, Luz Arias y a todos aquellos quienes también fueron más que compañeros en esta etapa del camino recorrido.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron para que nuestras metas se hayan alcanzado.

Gracias.

Mil gracias...

INDICE DE CONTENIDO

	Pag
Resumen	xi
Introducción	12
CAPÍTULO I	
EL PROBLEMA	
Planteamiento del problema	14
Formulación del problema	17
Objetivos	17
Justificación	18
CAPITULO II	
MARCO TEORICO	
Antecedentes de la investigación	20
Bases teóricas	26
Definición de términos básicos	44
Hipótesis	45
Variables	46
Criterios	46
CAPITULO III	
MARCO METODOLOGICO	
Tipo de investigación	48
Diseño de la investigación	48
Población y muestra	50
Instrumento para la recolección de datos	50
Materiales y métodos de la fase experimental	51
Análisis y procesamiento de datos	56
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSION	

Resultados	57
Discusión de resultados	68
CAPITULO V	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones	81
Recomendaciones	83
Bibliografía	85

bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Distribución por género de los neonatos prematuros y a término	58
Tabla 2. Distribución según niveles de prematuridad por edad gestacional en los neonatos pretérmino	59
Tabla 3. Distribución según peso al nacer (PA) en los neonatos prematuros	60
Tabla 4. Descriptivos de las variables antropométricas y obstétricas de los neonatos	61
Tabla 5. Relación de las concentraciones plasmáticas de la arginina y citrulina con variables perinatales de nacimiento en neonatos a término y prematuros	67

bdigital.ula.ve

INDICE DE GRAFICOS

	Pag
Figura 1. Distribución de los neonatos pertenecientes al estudio según la condición de nacimiento	57
Figura 2. Relación arginina citrulina en los recién nacidos pretérmino	62
Figura 3. Relación arginina citrulina en los recién nacidos a término	63
Figura 4. Relación entre la concentración plasmática de arginina y citrulina en neonatos a término de adecuado peso al nacer y prematuros de bajo peso al nacer	64
Figura 5. Niveles de arginina en neonatos: grupo de estudio vs grupo comparativo	65
Figura 6. Niveles séricos de citrulina en neonatos: grupo de estudio vs grupo comparativo	66

bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA



**NIVELES SÉRICOS DE ARGININA Y CITRULINA EN NEONATOS DEL
INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES
I.A.H.U.L.A.: A TRAVÉS DE UN ESTUDIO COMPARATIVO**

AUTORES:

Contreras Mike C.I: 19.597.599

Gallardo María C.I: 20.099.182

TUTOR:

Lcda. Iraima D'Jesus C.I: 9.476.234

La presente investigación de tipo observacional, descriptivo, de cohorte transversal estudió el dosaje sérico de arginina (Arg) y citrulina (Cit) en neonatos del I.A.H.U.L.A. La técnica usada fue electroforesis capilar (EC) con detección de fluorescencia inducida por láser, en suero sanguíneo de los recién nacidos. Se encontró correlación entre los niveles séricos de Arg y Cit para los neonatos a término siendo más elevados que el de los neonatos pretérmino, los cuales en ellos no hubo correlación entre aminoácidos. Estos hallazgos evidencian que los neonatos en diferentes etapas de la prematuridad son metabólicamente distintos y sugiere crear valores referenciales de niveles plasmáticos y séricos de aminoácidos para estos grupos vulnerables y para la población venezolana.

Palabras claves: arginina, citrulina, electroforesis.

INTRODUCCIÓN

La evaluación del estado nutricional del recién nacido o neonato (RN) es fundamental, debido a las evidencias cuantiosas de una asociación significativa del peso bajo al nacer (PBN), con mayor morbilidad y mortalidad perinatal, prematuridad, parálisis cerebral y efectos adversos tanto en la infancia como en la vida adulta. (Centro de Atención Nutricional Infantil de Antimano [CANIA], 2009). Por otra parte hay conceptos y premisas que sustentaban el manejo clínico de estos RN que han cambiado con base en evidencias aportadas por estudios de un número muy importante de RN con PBN para la edad gestacional (PBEG) (CANIA, 2009).

bdigital.ula.ve

Por otra parte la identificación precoz y afectiva de las causas de los problemas que el RN pueda presentar permitirá un manejo adecuado de los casos y la prevención de aquellas complicaciones, tanto perinatales como a largo plazo relacionadas con esta problemática (CANIA, 2009).

El aminoácido arginina juega un papel clave en muchos procesos metabólicos en la salud y enfermedad, tales como en la desintoxicación de amoníaco (ciclo de la urea), en la síntesis de poliaminas y la creatinina, en la modulación de la función inmune, en la liberación de hormonas anabólicas, y en la síntesis de óxido nítrico (NO). La arginina es considerada un aminoácido condicionalmente esencial porque la

síntesis de arginina endógena puede no ser suficiente para satisfacer las necesidades metabólicas, especialmente durante el crecimiento de bebés y niños durante condiciones altamente catabólicas. Los niños con enfermedades críticas, por tanto, pueden estar en riesgo de desarrollar deficiencia de arginina (Van Waardenburg, Betue, Luiking, Engel, & Deutz, 2007).

La implementación de la cuantificación de aminoácidos y la comparación con los valores de referencia de aminoácidos en plasma permitirá aumentar el conocimiento sobre la incidencia de patologías, junto con otros factores, su diagnóstico preciso y oportuno y la implementación de un adecuado seguimiento nutricional (Malaver et al, 2009).

bdigital.ula.ve

Bajo el fundamento teórico que alega acerca de la importancia del aminoácido arginina considerado como un aminoácido condicionalmente esencial para ciertas condiciones patológicas que se presentan dentro del ciclo vital es de real importancia hacer diagnóstico bioquímico – nutricional. Posteriormente a ello se podrán tomar decisiones clínicas en el suministro de este nutriente para optimizar el lapso nutricional por el cual cursa los niveles del analito que se presenten en un momento dado.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

En las últimas décadas, las tasas de supervivencia de niños nacidos prematuros en especial con muy bajo peso (RNPMBP), aumentaron de forma considerable, en parte debido a que el conocimiento de las peculiaridades nutricionales de estos niños ha evolucionado de manera sistemática. La nutrición ejerce un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo del RN y su principal objetivo es abastecer nutrientes para mantener un crecimiento similar al de la etapa intrauterina y garantizar un desarrollo intelectual, cognitivo y motor satisfactorio a largo plazo. Los prematuros y RN de BPN presentan reservas disminuidas de nutrientes y en consecuencia su tolerancia al ayuno es limitada (Setton & Fernández, 2014).

Nada más en la ciudad de Mérida nacieron en el 2014 (hasta el mes de septiembre) 11.771 neonatos, dentro de lo cual 268 eran bajo peso. Así mismo en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes del estado Mérida

(I.A.H.U.L.A) nacieron 3.712 neonatos; de los cuales 234 resultaron ser bajo de peso según la Corporación de Salud del estado Mérida.

Se ha documentado ampliamente que los neonatos de muy bajo peso al nacer (MBPN) no tienen la capacidad de cubrir sus necesidades de cisteína, taurina, histidina y arginina. Por lo tanto, estos aminoácidos son considerados condicionalmente esenciales para este grupo de edad (Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría [SVPP], 2009).

bdigital.ula.ve

Además, de los 10 aminoácidos esenciales de la infancia, la arginina, glutamina y los aminoácidos ramificados son considerados condicionalmente indispensables para pacientes con estrés. La arginina es sintetizada por el enterocito, tiene un rol inmunológico y es sustrato para síntesis de óxido nítrico; existen estudios que muestran niveles plasmáticos de arginina disminuidos en recién nacidos con hipertensión pulmonar y en neonatos que inician una enterocolitis necrotizante (SVPP, 2009).

Con respecto a los aminoácidos esenciales se deben aportar en cantidades que cubran los requerimientos mínimos; pero no debe descuidarse el aporte de los semiesenciales: tirosina, histidina, glicina, glutamina y arginina, ya que si no hay un aporte adecuado, los esenciales serán utilizados para su producción en lugar de ir a la requerida síntesis proteica. Esta situación es frecuente cuando el pretérmino sufre enfermedades intercurrentes y no se frena la proteólisis por medio de una intervención nutricional parcial (Gil, 2010).

Hace ya mucho tiempo que se admitió que los requerimientos de la arginina pueden alterarse en ciertas patologías. Es evidente por su posición en el ciclo de la urea que la arginina puede sintetizarse fácilmente en el organismo. A pesar de ello una dieta libre de arginina origina disminución del crecimiento y produce hepatotoxicidad en varios modelos animales. Por otra parte, las soluciones de nutrición parenteral (NPT) exentas de arginina causan hiperamonemia, acidosis metabólicas y coma en la especie humana. Además la síntesis de arginina esta disminuida en los RN, especialmente en los prematuros debido a que varias enzimas del ciclo de la urea maduran alrededor del crecimiento (Gil & Sánchez, 2005).

La arginina es inusualmente abundante en el fluido alantoideo durante la primera etapa de la gestación (4 – 5 mmol/L) lo que habla en favor de la función de este aminoácido en la nutrición y el metabolismo de la unidad fetoplacentaria. Las

poliaminas y el óxido nítrico (NO) son esenciales para la implantación y desarrollo del embrión, así como para la angiogénesis de la placenta, lo que permite el suministro adecuado de nutrientes al feto. La deficiencia de arginina causa crecimiento intrauterino retardado y aumento de la mortalidad perinatal en animales. (Gil, 2010).

A pesar de los estudios realizados en animales se sabe muy poco de los mecanismos para mantener la homeostasis de la arginina en el feto. No obstante, estudios recientes indican que durante la última etapa de la gestación, la captación uterina de arginina no es suficiente para satisfacer los requerimientos fetales, por lo que probablemente la síntesis fetal endógena a partir de glutamina y citrulina desempeña un papel fundamental durante el periodo perinatal (Gil, 2010).

Son muchos los trabajos que describen una progresiva disminución de las actividades de diversas enzimas del metabolismo de los aminoácidos a medida que avanza la gestación. Todos estos cambios se enmarcan en un contexto de ahorro de nitrógeno, así como también los descensos en la actividad de las enzimas del ciclo de la urea, que son ya apreciables en etapas muy tempranas del período; no obstante, difícilmente puede residir la causa de la disminución en la producción de urea en las bajas actividades de enzimas que en la mayor parte de los casos ni son limitantes de sus vías ni trabajan tampoco en condiciones cercanas a la saturación (Herrera, 1998).

El único modulador alósterico descrito hasta la fecha implicado en la regulación del ciclo de la urea es el N-acetil glutamato, activador de la carbamil-fosfato sintetasa I, enzima que cataliza la entrada de amonio al ciclo mediante la síntesis de carbamil-fosfato. A su vez, el N-acetil glutamato se sintetiza a partir de acetil- CoA y glutamato a través de la reacción catalizada por la N-acetil glutamato sintetasa (Herrera, 1998).

La arginina es activador alostérico de esta última enzima, aunque su presencia no sea imprescindible para que se desarrolle su actividad. Se supone que una eventual deficiencia en este aminoácido induciría una disminución de la síntesis de carbamil-fosfato y esto a su vez resultaría en un menor flujo ureagénico (Herrera, 1998).

Así un bloqueo del suministro de arginina puede causar una deficiencia en la síntesis endógena de arginina y conllevar retraso del crecimiento intrauterino. De cualquier forma se ha descrito que la actividad de arginina succinato liasa es baja tanto en la prematuridad como en situaciones de desnutrición en los lactantes, lo que conduce a niveles séricos disminuidos de arginina y por lo tanto a la detención del crecimiento (Gil, 2010).

Los requerimientos de arginina por todos los mamíferos jóvenes son muy elevados debido a la abundancia relativa de este aminoácido en las proteínas y a sus funciones en el desarrollo. En los requerimientos que deben contener las fórmulas para pretérmino se considera que la arginina debe tener un cantidad mínima de 72 mg/ 100 kcal y una cantidad máxima de 104 mg/ 100 kcal (Gil, 2010). Paradójicamente las soluciones usadas en nutrición parenteral en la infancia son deficientes en arginina o no contienen glutamina; un aminoácido condicionalmente esencial para el prematuro y precursor mayoritario en la síntesis de arginina (Gil, 2010).

Las soluciones disponibles para el recién nacido están diseñadas basándose en el aminograma plasmático de un recién nacido a término a la edad de 1 mes, 2 horas postprandial, sano, con lactancia materna. Este estándar tiene algunas limitaciones para los prematuros extremos, que presentan estrés infeccioso o quirúrgico, inmadurez renal, hepática y, además, el aminograma no solo es el resultante de la leche ingerida sino que suma el efecto de la síntesis y metabolización de aminoácidos en el enterocito y el hígado (Gil, 2010).

Así , se ha demostrado la existencia de hiperamonemia en más del 50% de los niños pretérmino que reciben NPT exclusiva con soluciones que no contienen glutamina, ornitina o citrulina, y el tratamiento efectivo por administración intravenoso de arginina. La hiperamonemia es paralela a la hipoargininemia (< 32

mmol/L, un tercio de la concentración encontrada en los niños alimentados al pecho). Además en estos niños los bajos niveles de arginina se asocian a una mayor incidencia y gravedad del síndrome de distrés respiratorio neonatal (SDRN), la enfermedad pulmonar más frecuente en los neonatos, así como enterocolitis necrotizante (Gil, 2010).

Así mismo en los recién nacidos prematuros (RNP) alimentados por vía enteral con 2 g/kg/día de proteína (una cantidad suficiente para los lactantes normales), se produce hipoargininemia, lo que indica que el suministro dietético de este aminoácido en cantidad suficiente es fundamental para el desarrollo del niño prematuro. Se necesitan estudios en la infancia para definir los requerimientos dietéticos en arginina, no obstante estudios en cerdos lactantes indican que al menos del 60% de las necesidades de arginina en el periodo neonatal se satisfacen mediante síntesis endógena (Gil, 2010).

La inhibición de la síntesis de citrulina en el intestino da como resultado inmediato la disminución de la concentración de arginina en el intestino y la detención del crecimiento. Las proteínas se aportan como soluciones de aminoácidos (aa) cristalinos. Las soluciones especiales para recién nacidos son las más adecuadas para la nutrición neonatal (Gil, 2010).

Formulación del problema

¿Qué relación guarda la concentración sérica de arginina y citrulina en los neonatos prematuros y neonatos a término?

Objetivos

Objetivo general

- Determinar el dosaje sérico de arginina y citrulina en neonatos del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (I.A.H.U.L.A).

Objetivos específicos

- Dominar la técnica de electroforesis capilar (EC) como técnica especial para la detección de moléculas a través de marcaje con fluorescencia.
- Precisar la arginina y citrulina en neonatos prematuros como grupo objetivo de estudio.
- Precisar la arginina y citrulina en neonatos a término como grupo comparativo del comportamiento metabólico de ambos aminoácidos.
- Contrastar la dinámica existente entre los niveles séricos de arginina y citrulina del grupo de estudio y grupo comparativo, así como la relación con

variables antropométricas y obstétricas como el peso al nacer (PAN) y la edad gestacional (EG).

Justificación

La arginina es un aminoácido que es nutricionalmente esencial para el feto y el recién nacido. Un problema nutricional significativo en los RNP es una deficiencia grave de arginina (hipoargininemia) lo que puede resultar una hiperamonemia, así como compromisos del sistema cardiovascular, pulmonar, neurológico y la disfunción intestinal. La deficiencia de arginina puede contribuir a la alta tasa de morbilidad y mortalidad infantil asociada a los nacimientos prematuros (Wu, Jaeger, Bazer & Rhoads, 2003). En Venezuela para el 2011, el porcentaje de recién nacidos con bajo peso al nacer es de 8,2. Así mismo la tasa de mortalidad infantil por cada 1000 n.v (que abarca desde el nacimiento hasta el 1 año) es de 13,9 de ahí que la tasa de mortalidad neonatal por cada 1000 n.v (que abarca desde el nacimiento hasta los 28 días de vida) es de 9,7 y la mortalidad postneonatal por cada 1000 n.v (que abarca desde los 28 días de vida hasta el primer año de vida) es de 4,2 (UNICEF, 2011).

Sobre la base de los hallazgos recientes, proponemos que la citrulina intestinal y la síntesis de arginina (la principal fuente endógena de arginina) está limitada en neonatos prematuros debido a la expresión limitada de los genes para las enzimas

clave (por ejemplo: pirrolina – 5 – carboxilato sintasa, arginosuccinato sintasa y la liasa) contribuyendo así a la hipoargininemia. El suministro de la combinación de cortisol y arginina permite el acortamiento de la estancia de los RNP en los hospitales así como la maduración acelerada de órganos y la restauración de la alimentación enteral total. (Wu, Jaeger, Bazer & Rhoads, 2004).

Los estudios nutricionales frecuentemente deberían tomar en consideración las concentraciones de aminoácidos en plasma con el fin de evaluar la adecuación de la ingesta de proteínas en los bebés prematuros. Se sugiere que la concentración de aminoácidos en sangre puede ser considerado como un valor referencial adecuado y un nivel seguro para el crecimiento de los RN prematuros (Rigo & Senterre, 1987).

Aunque la hipoargininemia en RNP ha sido reconocida por más de 30 años, se sigue produciendo en las unidades de cuidados intensivos neonatales de los Estados Unidos y en todo el mundo. Estudios del metabolismo de la arginina fetal y neonatal continuarán avanzando nuestra comprensión de los mecanismos responsables de la supervivencia y el crecimiento de los RNP. Este nuevo conocimiento será beneficioso para el diseño de la próxima generación de soluciones de aminoácidos enterales y parenterales para optimizar la nutrición y la salud en esta población en peligro (Wu, Jaeger, Bazer & Rhoads, 2004).

CAPITULO II

MARCO TEORICO

Antecedentes de la investigación

En el 2000 el departamento de Pediatría de la Escuela de Medicina de la Universidad de Carolina del Norte (USA) investigó la reducción de las concentraciones de aminoácidos en suero en lactantes con NEC(enterocolitis necrotizante) para determinar si los bebés prematuros con NEC tienen deficiencias en glutamina y arginina, que son esenciales para la integridad intestinal. Realizaron estudio prospectivo de cohortes de 4 meses de aminoácidos en suero y los niveles de urea en los bebés prematuros. Los niveles de aminoácidos y urea en suero se midieron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y métodos enzimáticos, respectivamente, en las muestras obtenidas en los días de vida 3, 7, 14, y 21. Los recién nacidos en el grupo control (n=32) y los grupos de NEC (n =13) fueron comparables para el peso al nacer, la edad gestacional, y las puntuaciones de Apgar. La NEC comenzó con un día de vida media de 14,5 (IC del 95%, los días de la vida del 11 al 18). Los valores medianos de glutamina fueron 37% a 57% menor en el grupo NEC en los días 7, 14 y 21 en comparación con los del grupo control. En los

días 7 y 14 los valores en la mediana de arginina, glutamina, alanina, lisina, ornitina, treonina se redujeron 36% a 67% en el grupo con NEC. Los Aminoácidos no esenciales totales y aminoácidos esenciales totales fueron de 35% y un 50% menor en el grupo NEC en los días 7 y 14. Los recién nacidos con NEC tenían reducciones significativas en glutamina y arginina 7 días antes del inicio de la NEC. Los resultados mostraron que los bebés que tienen NEC tienen deficiencias de aminoácidos selectivos, incluyendo los niveles reducidos de glutamina y arginina que pueden predisponer a la enfermedad (Becker, et al, 2000).

Posteriormente en el año 2007 el Departamento de Cirugía, de la Universidad Central de Medicina, Ámsterdam (Países Bajos) publicó un estudio sobre las bajas concentraciones plasmáticas de arginina y dimetilarginina asimétrica (ADMA) en los bebés prematuros con enterocolitis necrotizante. Investigaron si las concentraciones plasmáticas de arginina, ADMA y si la relación arginina/ADMA es diferente entre los bebés prematuros con y sin NEC y entre los sobrevivientes y no sobrevivientes en el grupo de NEC. Hicieron un estudio prospectivo de casos y controles y concentraciones de arginina y ADMA se midieron en 10 recién nacidos prematuros con NEC (edad gestacional media de 193 días, y de peso al nacer 968 g), y 10 infantes de control emparejados (edad gestacional media de 201 días, y de peso al nacer 1102 g), que ingresaron en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. En los recién nacidos prematuros con NEC los promedios de las concentraciones de arginina y de ADMA así como la relación arginina/ADMA fueron menores en

comparación con los lactantes sin NEC. En el grupo con NEC, la concentración promedio de arginina y la relación arginina/ADMA fueron más bajas en los lactantes no sobrevivientes que en los bebés que sobrevivieron. En los recién nacidos prematuros con NEC no sólo la arginina sustrato (RNOS), sino también el inhibidor endógeno de ADMA sustrato (ADMANOS) y la relación RNOS/ADMANOS fueron más bajas que en los lactantes sin NEC. Además, bajos niveles de arginina y la relación arginina/ADMA se asocian con la mortalidad en recién nacidos con NEC. En general, estos datos sugieren que una disminución de la producción de óxido nítrico puede estar implicada en la fisiopatología de la NEC (Richir, et al, 2007).

En el mismo año la Sociedad Americana de Nutrición Clínica estudió las concentraciones plasmáticas de arginina y citrulina en niños críticamente enfermos y encontró una fuerte relación con la inflamación. En este estudio se midieron las concentraciones plasmáticas arteriales de arginina y otros aminoácidos implicados en el metabolismo de arginina (citrulina, glutamina, y ornitina) en diferentes grupos de diagnóstico de niños gravemente enfermos, tanto en la fase aguda como durante la recuperación; fue un estudio observacional de cohortes en niños con enfermedad respiratoria viral (n=21; grupo control), trauma accidental o quirúrgico (n=19), o sepsis (n=19) que fueron admitidos en una unidad de cuidados intensivos pediátricos. Los resultados muestran claramente que las concentraciones de arginina en plasma están disminuidas en la fase aguda de la enfermedad crítica, mientras que se observa un aumento gradual en las concentraciones plasmáticas durante la recuperación.

Durante la recuperación, las concentraciones plasmática de arginina y citrulina aumentaron y estuvieron fuertemente relacionados con la reducción de la inflamación, como se muestra por la correlación inversa entre las concentraciones de arginina y citrulina y la concentración de PCR (Van Waardenburg, Betue, Luiking, Engel, & Deutz, 2007).

En el 2008 el Departamento de Cirugía, de la Universidad Central de Medicina, Ámsterdam (Países Bajos) investigaron las concentraciones plasmáticas de ADMA en los recién nacidos prematuros con y sin ventilación mecánica en un estudio piloto prospectivo. Determinaron la relación entre ADMA y la duración de la ventilación mecánica en 30 RNP con una edad gestacional promedio de 29,3 semanas y peso al nacer de 1.340 gramos, todos pertenecientes a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Centro Médico Universitario. Se midieron ADMA y arginina en la sangre del cordón umbilical y se relacionó con la duración de la ventilación mecánica registrada en días. Obtuvieron en sus resultados que la edad gestacional y el peso al nacer fueron significativamente menores en los bebés que requieren ventilación mecánica y que no se correlacionaron significativamente con la concentración de ADMA en plasma después de su nacimiento. Las concentraciones plasmáticas de ADMA fueron significativamente mayores en los bebés que requieren ventilación mecánica que en los bebés no ventilados. La Concentración de ADMA se relacionó significativamente con la duración de la ventilación mecánica, incluso después del ajuste para la edad gestacional. Concluyeron que los niveles de ADMA

en el nacimiento están relacionados con la duración de la ventilación mecánica. Un aumento de la concentración de ADMA podría reducir la síntesis de NO, lo que podría dar lugar a intercambio de gases insuficiente y, en consecuencia, un período de ventilación mecánica por más tiempo (Richir et al, 2008).

Para el 2013 la unidad de cuidados intensivos neonatales del hospital salud materno infantil en Mersin (Turquía) investigaron la reducción de los niveles plasmáticos de citrulina y arginina en recién nacidos de bajo peso al nacer con enterocolitis necrotizante. Midieron los niveles plasmáticos de citrulina y arginina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en recién nacidos con una edad gestacional < 32 semanas y $\leq 1,500$ g que desarrollaron etapa de NEC II / III. Se incluyó en el estudio a 36 bebés prematuros, de los cuales 20 presentaban NEC y 16 controles. Las medias de los niveles citrulina en los grupos de NEC y control fueron 8,6 y 20,18 mmol / l ($p < 0,05$), y la mediana para los niveles de citrulina fue 13,15 mmol / l con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 82%. Así mismo las medias de los niveles de arginina de los grupos de NEC y de control fueron 22,02 y 39,89 mmol / l ($p < 0,05$), y la mediana para los niveles de arginina fue 28,52 mmol / l con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 75%. El día de la toma de muestra, el género, la Nutrición enteral y parenteral no afectaron los niveles de los aminoácidos. Encontrándose niveles inferiores de citrulina y arginina en recién nacidos prematuros con NEC. Se necesitan más estudios para determinar los niveles más adecuados para predecir las opciones de recuperación, pronóstico de la NEC y el

tratamiento con estos aminoácidos en los recién nacidos prematuros (Celik, Demirel, Canpolat & Dilmen, 2013).

En el 2014 el departamento de Pediatría del centro médico de la universidad de Maastricht (Países Bajos) estudiaron los niveles plasmáticos de dimetilargininas en neonatos prematuros de muy bajo peso al nacer y su relación con factores perinatales. Investigaron la asociación entre los niveles plasmáticos de ADMA, L-arginina y citrulina con factores perinatales (edad gestacional y peso) en 130 prematuros de muy bajo peso al nacer (<1.500g) y en edad gestacional (≤ 30 semanas de gestación). Las muestras de plasma se recogieron entre las 6-12 h después del nacimiento. No se encontraron correlaciones significativas entre ADMA, niveles L-arginina y citrulina y EDAD gestacional y peso de nacimiento. Sin embargo, la arginina: en su proporción de ADMA se correlacionó positivamente con la edad gestacional. La ADMA y niveles de arginina no fueron significativamente diferentes entre hombres y mujeres, pero mostraron una correlación negativa entre los niveles de ADMA y la edad gestacional en hombres. Por lo tanto, sugirieron que la alteración de la disponibilidad de NO puede desempeñar un papel en los sistemas respiratorio y adaptación cardiovascular en MBPN prematuros recién nacidos (Moone, et al, 2014).

Bases teóricas

Arginina

La arginina es aminoácido condicionalmente esencial, clasificado como básico, porque se encuentra cargado positivamente a pH neutro. Contiene cuatro grupos nitrogenados que le hacen participar significativamente en el metabolismo del nitrógeno, sobre todo en el ciclo de la urea (Verdú, 2009).

Se considera un aminoácido condicionalmente esencial, al igual que la glutamina y que otros compuestos, porque la capacidad de síntesis endógena no puede cubrir las demandas que ocurren en determinadas situaciones (Verdú, 2009).

Funciones fisiológica y bioquímica de la arginina

- Síntesis proteica
- Regulación de la secreción hormonal (insulina, glucagón, hormona del crecimiento, factor de crecimiento análogo a la insulina, progesterona, lactógeno placentario y prolactina)
- Síntesis de creatina
- Activación alostérica del N – acetilglutamato
- Detoxificación de amonio (síntesis de urea)
- Síntesis de óxido nítrico
- Activación de la síntesis de tetrahidrobiopterina

- Síntesis de agmatina y producción del óxido nítrico sintasa, ornitina descarboxilasa y monoaminooxidasa
- Activación de la vía de señalización de mTOR
- Regulación de la expresión génica
- Metilación de proteínas
- Desanimación de proteínas
- Regulación de la función endotelial, tono vascular, hemodinámica y angiogénesis
- Regulación de la producción (espermatogénesis, embriogénesis y fertilidad)
- Regulación de la inmunidad
- Regulación de la función neuronal
- Regulación del recambio y el metabolismo energético muscular
- Reparación tisular y regulación de la tumorigénesis (Gil, 2010).

Metabolismo

La síntesis de arginina se realiza fundamentalmente en el hígado, formando parte del ciclo de la urea, pero esta arginina no va a formar parte de las necesidades de otros tejidos, porque la mayoría de la arginina que se forma es degradada a ornitina por la arginasa. De hecho, la concentración de arginina en el hígado es muy baja (0,003 – 0,1 mmol) comparada con la de otros aminoácidos (0,5 – 10 mmol). La arginina necesaria para otras funciones debería escapar del ciclo, lo que supone una importante limitación en condiciones de requerimientos acentuados, no obstante, la arginina

puede sintetizarse en otras zonas del organismo. Concretamente, en la mucosa intestinal se forma ornitina a partir de glutamina, glutamato y prolina, y esta citrulina puede convertirse en el riñón en arginina por una ruta análoga a la que funciona para la ureagénesis hepática (Gil, 2010).

El intestino de los mamíferos es el único lugar del organismo donde se expresa las 3 enzimas claves para la síntesis de citrulina (pirrolina – 5 – carboxilato sintasa, prolina oxidasa y N – acetilglutamato sintasa). No obstante recientemente se ha demostrado la presencia de un ciclo de la urea funcional en los enterocitos que sirve como primera línea de defensa funcional contra la toxicidad por amonio en los mamíferos. Hay que señalar a este respecto que actualmente se conoce, en contra de la creencia generalizada, que 30 – 50 % de los aminoácidos esenciales de la dieta son catalizados a su paso por el intestino por ejemplo, el 40% de la leucina, el 30% de la isoleucina y el 40% de la valina procedentes de la dieta son drenados por el intestino y alrededor del 20% se utilizan por la mucosa intestinal para la síntesis proteica. De acuerdo con ello, los aminoácidos de cadena ramificada son transaminados hasta los cetoácidos correspondientes en una proporción comparable a la que ocurren en el musculo esquelético. La formación de la urea intestinal, y no solo la hepática, es por lo tanto, un aspecto metabólico grave en la detoxificación por amonio. El 40% de la arginina de la dieta no entra en la circulación sistémica y es degradada en el intestino.

Síntesis de péptidos y proteínas: puede existir situaciones en las que la demanda de arginina supere su disponibilidad esto ocurre, como por ejemplo en fases de

crecimiento (recién nacidos) o cuando debe una intensa proliferación celular (situaciones de estrés metabólico) (Gil, 2010).

Funcionamiento del ciclo de la urea: la arginina no solamente es un intermediario en el proceso de la ureogénesis, sino que también posee una acción reguladora positiva sobre esta vía metabólica. La falta de arginina, por lo tanto puede afectar negativamente la producción de urea. Formación de óxido nítrico (NO): la arginina es el sustrato a partir del cual se forma al NO gracias a la acción de la enzima NO sintasa. El NO cumple funciones fisiológicas muy importantes entre las que destaca su acción vasodilatadora. Formación de creatinina: la creatinina es una molécula que sirve para almacena energía y constituye una parte cuantitativamente importante del consumo metabólico de arginina (2, 3g/día) (Gil, 2010).

Otros procesos biosintéticos: a partir de arginina se forma ornitina dentro del ciclo de la urea. Así mismo la ornitina se forma prácticamente en las mitocondrias de los mismos tejidos extrahepáticos por acción de la arginasa de tipo II, una enzima que desempeña un papel importante en la regulación de síntesis de NO, prolina y poliaminas. Además de participar en el ciclo de la urea, la ornitina puede seguir otras vías metabólicas. Una de ellas conduce a la prolina, un aminoácido fundamental para la síntesis de colágeno, que puede explicar la eficacia de la arginina para estimular la curación de heridas. Otra de ellas conduce a glutamato en reacción inversa a su síntesis.

Por último la ornitina se utiliza en la formación de poliaminas, que son compuestos que activan la proliferación celular. Otro derivado metabólico de la arginina es la agmatina. Este compuesto puede contribuir también a la síntesis de poliaminas y tiene interesantes propiedades reguladoras (Gil, 2010).

Función endotelial

El mecanismo de la arginina como protección de la salud cardiovascular no se pudo explicar hasta que se descubrió la naturaleza química del denominado factor relajante derivado del endotelio y se identificó con el óxido nítrico; este compuesto deriva enzimáticamente de la arginina y tiene numerosas capacidades funcionales. La formación de óxido nítrico a partir de arginina está catalizada por una enzima denominada óxido nítrico sintasa (NOS) y requiere la aportación de oxígeno molecular y la colaboración de numerosas moléculas coenzimáticas (tetrahidropterina, NADH y FMN y FAD) (Gil, 2010).

Es de mencionar que las funciones del óxido nítrico son muy diversas dependiendo del tejido en el que se produce y de las circunstancias fisiológicas o patológicas. De hecho, existen tres isoformas de la óxido nítrico sintasa las denominadas óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS o NOS – I) y óxido nítrico sintasa

endotelial (eNOS o NOS - III) son enzimas constitutivas dependen del sistema calcio – calmodulina y se puede considerar claramente protectoras o fisiológicas. En efecto el NO está implicado en la función neuronal y la función endotelial (Gil, 2010).

La producción de NO por las células endoteliales produce efectos vasodilatadores y antiescleróticos, siendo además antiagregante plaquetario. Ambas enzimas, nNOS y eNOS produce NO en pequeñas cantidades pero de manera continua. En cambio la denominada la denominada Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS o NOS – II) se forma en muchos tejidos (macrófagos, hepatocitos, células del músculo liso de pared vascular, etc) no depende del calcio y se forma en cantidades importantes cuando se induce por las citoquinas proinflamatorias. En estas condiciones por ejemplo el NO producido por los macrófagos se utiliza para destruir las bacterias fagocitadas (Gil, 2010).

Es interesante señalar que la agmatina, un compuesto derivado de la arginina por descarboxilación, parece regular la producción de NO a través de su interacción con las distintas isoformas de la NOS. La propia agmatina activa a las enzimas constitutivas (nNOS y eNOS) porque favorece la liberación de iones calcio. Por otra parte un derivado oxidado de la agmatina inhibe a la iNOS. La acción vasoprotectora de la arginina podría explicarse, en consecuencia, por su capacidad de aumentar la producción de NO en el endotelio vascular. Sin embargo, el estudio detallado de esta reacción enzimática indica que la eNOS tiene una K_m (de orden micromolar) y por lo

tanto una gran afinidad por su sustrato, al arginina, y, por otra parte, que las concentraciones endoteliales de arginina son muy altas (de orden milimolal). Por lo tanto no debería haber ningún problema para el funcionamiento de la enzima como consecuencia de variaciones en las concentraciones de sustratos debidas a su aporte nutricional (Gil, 2010).

Se denominó “paradoja de la arginina” donde los estudios experimentales lo mostraron efectos vasodilatadores directos de la arginina ni en animales ni en seres humanos. Sin embargo, sí se encontraron estos efectos vasodilatadores en condiciones de hipercolesterolemia. Entre las posibles explicaciones de esta paradoja de la arginina destaca la existencia de un inhibidor competitivo endógeno de la eNOS, descubierto en 1922 en pacientes con insuficiencia renal, denominado dimetilarginina (ADMA) los dos metilos están unidos a un solo nitrógeno del grupo guanido y que esta aumentado en estas condiciones y en otras situaciones patológicas como la hipercolesterolemia, aterosclerosis y la hipertensión arterial (Gil, 2010).

En efecto, algunos estudios de intervención indican que la suplementación con arginina mejora la función endotelial en pacientes con enfermedad coronaria. Además el tratamiento largo plazo con arginina disminuye los síntomas de la enfermedad vascular en paciente con aterosclerosis periférica y coronaria (Gil, 2010).

La ADMA procede de hidrolisis de proteínas nucleares previamente metilada, implicada en el procesado y transcripción del ARN; las enzimas responsables de estas metilaciones se denominan proteína-arginina metil-transferasas (PRMT). Una vez hidrolizada las proteínas que contienen restos de ADMA, este metabolito puede tener varios destinos: excreción renal, hidrolisis hasta citrulina y metilamina otras vías metabólicas secundarias (transaminación en el riñón o acetilación en el hígado) (Gil, 2010).

Las concentraciones endoteliales de óxido nítrico pueden descender por dos mecanismos principales: la inhibición de la NOS por ADMA y la reacción del óxido nítrico con el radical superóxido. La causa mejor establecida del aumento de las concentraciones plasmáticas del ADMA es la insuficiencia renal (Gil, 2010).

En resumen, la mayoría de los estudios realizados, hasta la fecha sugiere que la suplementación con arginina favorece la función endotelial. En cualquier caso, parece claro que la determinación de la ADMA plasmático es un buen marcador biológico de riesgo aterogénico, especialmente en pacientes con enfermedades renales (Gil, 2010).

Electroforesis Capilar

Historia

El desplazamiento de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico fue citado por Reuss en 1809 en las memorias de la Sociedad Imperial Natural (Moscow) (1809). Allí se describe la experiencia, donde se observa el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena en un ámbito de agua transparente contenido en un recipiente de vidrio con un lecho de arena fina en su fondo y dos tubos conteniendo electrodos de una batería. El pasaje de la corriente produce un enturbiamiento en las proximidades del polo positivo producido por la migración de partículas de arena muy pequeñas que se movilizan por su carga eléctrica negativa. Este experimento puede ser considerado como el primer aporte bibliográfico que revela la polarización de la sílice, pues la arena es dióxido de silicio y fundida permite obtener los capilares que se emplean en la electroforesis capilar (Castagnino, 2000).

Varios años más tarde, en 1816, fue observado el transporte del agua por acción de la corriente galvánica generada por la polarización negativa del capilar que une los dos recipientes electródicos. La pared del capilar, sabemos hoy, adquiere carga negativa (al pasaje de la corriente eléctrica) produciéndose la polarización del agua, la que por consiguiente tiende a desplazarse hacia el polo negativo. Esta corriente líquida que se desplaza en sentido opuesto a la dirección de la corriente eléctrica, se designa con el nombre de Fuerza electroendosmótica (FEO) (Castagnino, 2000).

Definición de electroforesis

Ha sido definida como el movimiento o desplazamiento diferencial de especies cargadas (iones), sustancias neutras o migración pasiva, por atracción o repulsión en un campo eléctrico. La electroforesis en solución en medios libres sin elementos soportes (agar, almidón, geles de poliacrilamida), fue desarrollada por Tiselius, el que resolvió mezclas de proteínas en un tubo aplicando un campo eléctrico de corriente continua, no pulsante, estudios que lo hicieron acreedor al Premio Nobel en Química (Castagnino, 2000).

Los problemas experimentales que se presentaron, estuvieron vinculados a la difusión térmica y a la convección, lo que determinó el empleo de medios anticonvectantes como agar, agarosa y poliacrilamidas en forma de geles. Las técnicas que más se han desarrollado están en la actualidad aplicadas al campo de las proteínas y productos de la biología molecular, como son los geles de agarosa y poliacrilamida en placas o films de distinto espesor verticales u horizontales (Castagnino, 2000).

Electroforesis capilar (EC)

El empleo de capilares para la separación de sustancias neutras o iones cargados eléctricamente, apareció en 1967 en una experiencia desarrollada por Hjerten empleando capilares milimétricos, los que eran rotados a través de su sección longitudinal para evitar los efectos de la convección. Virtanen y Mikkers en 1979 desarrollaron las separaciones empleando electroforesis en capilares de 200 μm de diámetro interno en vidrio y teflón respectivamente.

La separación de cloruro, aspartato y glutamato por isotacoforesis, hecha por Martin en 1942, los trabajos de Konstantinov, Oshukova en 1963 y los de Evereast en su tesis de graduación en 1964, fueron los precursores en el empleo de capilares y la medición de la absorción UV a través del mismo, permitió obtener los espectros característicos de la separación (Castagnino, 2000).

Más adelante, en 1980, Jorgenson y Lukacs empleando técnicas avanzadas en la obtención de capilares de sílica fundida emplean diámetros de 75 μm y Jorgenson clarifica teóricamente las relaciones entre los parámetros operacionales y las cualidades de la separación revelando el elevado potencial analítico de esta técnica. Esta separación de péptidos realizada sobre un capilar de sílica fundida a potenciales elevados 20 a 30 Kv en un campo de 400 a 500 v/cm refrigerados por aire, fue el

lanzamiento de la EC. La corriente electroendosmótica (FEO) generada por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución (Castagnino, 2000).

La ventaja de esta técnica es que el capilar de sílica fundida que generalmente se cubre con una capa de polimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventana a través de ella que permite el pasaje de la luz UV de tal manera que la visualización es on-line. Con esta técnica descrita es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea (Castagnino, 2000).

Corriente electroendosmótica

El componente efector más importante en la EC es la electroendósmosis o corriente electroendosmótica, o fuerza electroendosmótica. Surge como consecuencia de aplicar un campo eléctrico que genera una doble capa eléctrica entre la solución y la pared del capilar. En condiciones acuosas, la fase sólida posee un exceso de cargas negativas, como resultado de dos procesos físico-químicos, la ionización de la superficie (que es un equilibrio ácido-base) y por otra parte la adsorción de especies iónicas sobre la superficie del capilar. Estos procesos ocurren en el capilar al paso de

la corriente eléctrica y la FEO se encuentra altamente controlada por los numerosos grupos silanoles (SiOH) que también pueden existir como SiO (Castagnino, 2000).

Los círculos en grisado representan las moléculas de sílica transformadas por hidratación en silanoles en medio acuoso cuando pasa la corriente eléctrica. Los contraiones (cationes en la mayoría de los casos) mantienen el balance de cargas; ese potencial se llama potencial zeta. Cuando se aplica el voltaje a través del capilar, los cationes que forman la doble capa eléctrica migran hacia el polo positivo (Castagnino, 2000).

El aparato para electroforesis capilar (EC)

Está constituido por una fuente de poder (FP) de alto voltaje (20 a 30 Kv) y de 0 a 200 μ A, y un capilar de sílica de 25 a 75 μ m de diámetro interno y de 100 a 200 μ m de diámetro externo, el que puede estar refrigerado por aire o líquido por efecto Peltier. Los electrodos de platino se encuentran ubicados en el recipiente que contiene el buffer, que además de servir para su contacto recibe los extremos del capilar. El carrusel puede estar termostizado y contiene los buffers y las muestras. Con un movimiento de ascenso y descenso puede enviar cada una de las soluciones empleadas en la corrida al capilar o a los recipientes electródicos (Castagnino, 2000).

Los capilares de sílica dejan pasar la luz ultravioleta visible a distintas longitudes de onda, generando por arreglos de diodos, los espectros para la identificación de los compuestos separados por electroforesis capilar (Castagnino, 2000).

Aplicaciones de la EC

El explosivo avance de la electroforesis capilar se ha extendido al área biomédica, en el campo de las proteínas, péptidos, ADN, análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de drogas, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas, de abuso, y pericias forenses. En el área biofarmacéutica, para el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterápicos y de estructura quiral. En el área de alimentos, se le aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes. En el área de control ambiental, permite la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos (Castagnino, 2000). Como todo desarrollo de un área analítica nueva, la incorporación de técnicas acopladas como la espectroscopia de masa, fluorescencia inducida por láser y otras variantes permiten augurar un promisorio futuro (Castagnino, 2000).

Electroforesis capilar: ventajas

Las separaciones se realizan empleando mecanismos tradicionales, en un ámbito capilar, que además ofrece más facilidad y velocidad que la cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Mientras elimina el problema de los solventes de la HPLC, la toxicidad de los mismos y su costo, pues emplea soluciones acuosas en su gran mayoría con muy baja concentración iónica, incorpora los principios de la automatización a través de un hardware creado especialmente con un software altamente optimizado. Las separaciones se obtienen en pocos minutos, on line con la corrida, obteniéndose simultáneamente resultados cuantitativos, en oposición a los procedimientos tradicionales que utilizan horas o días (Castagnino, 2000).

Principio fisicoquímico de la EC

Las moléculas son separadas por las fuerzas del campo eléctrico aplicado. Recordemos que la electroforesis ha sido definida como el movimiento diferencial de especies cargadas (iones) o no, por atracción o repulsión en un campo eléctrico. Las muestras separadas en el capilar son monitoreadas por el detector y los picos del electroferograma son similares a los de la HPLC, y se generan como consecuencia de la concentración de los analitos y de su velocidad de migración (Castagnino, 2000).

Las muestras son introducidas en el capilar por electroforesis o por electrocinética, o por desplazamiento por inyección. Durante la inyección electroforética, el capilar

está sumergido en la muestra y se aplica el alto voltaje. Los iones de la muestra migran dentro del capilar en relación a sus movilidades electroforéticas. Si la fuerza iónica de la solución muestra es más baja que el buffer electroforético, los cambios en el campo eléctrico de la interfase muestra–buffer producen un efecto de enfoque o stacking, en el cual los iones del analíto aparecen concentradas alrededor de la zona de la interfase. Este proceso de delineamiento de la zona, puede producir incrementos en la detección de la sensibilidad y poder de resolución (Castagnino, 2000).

El efecto de enfoque, puede producir cambios sustanciales en la inyección electroforética (Castagnino, 2000).

Capilares

La electroforesis se efectúa en capilares de sílica fundida, de 25 a 75 μm de diámetro interno; los capilares son recubiertos externamente con una película de poliaminas, para protegerlos de los daños mecánicos. A los efectos de permitir el pasaje de la luz ultravioleta se practica una ventana quemando con un micromechero la capa plástica de protección (Castagnino, 2000).

Detección

Una amplia variedad de detectores han sido desarrollados para la EC (incluyendo fluorescencia, electroquímica y conductividad) pero los detectores más usados comercialmente son los que emplean el ultravioleta y UV visible. Los detectores son similares a los de la cromatografía líquida de alta performance, usando fuentes de deuterio con filtros o detección con longitudes de onda seleccionadas. Las fuentes de luz generalmente provienen de un haz de luz entre un fotodiodo de referencia y un microenfocado óptico en el estuche del capilar. El scanning es a través de un detector que ilumina el capilar con luz blanca luego dispersada y analizada a través de un policromador por arreglo de fotodiodos (detector PDA para óptica reversa) (Castagnino, 2000).

Alternativamente, el sistema óptico convencional (forward optic) puede ser empleado por una banda espectral aislada por un monocromador colocado entre la fuente de luz y el capilar. El escaneo puede ser controlado rápidamente por un sistema computarizado que controla el movimiento del monocromador en el rango espectral en el tiempo de milisegundo. Este sistema de detección produce menos ruido de fondo, y mucha más sensibilidad que el detector con arreglo de diodos PDA (Castagnino, 2000).

Clasificación de recién nacidos

En cuanto a la clasificación del estado del recién nacido (RN) viene definida por su edad gestacional y peso, dado a que son los factores más determinantes en la sobrevivencia del recién nacido son su madurez expresada en estos dos parámetros. El comité de expertos de la OMS los ha clasificado de la siguiente manera: (SVPP ,2009).

Según edad gestacional.

Recién nacido prematuro: menor de 37 semanas de gestación.

Prematuro moderado: entre 31-36 semanas de gestación.

Prematuro extremo: entre 28-30 semanas de gestación.

Recién nacido a término: mayor de 37 semanas y menor de 42 semanas de gestación.

Recién nacido posttérmino: mayor de 42 semanas de gestación (SVPP ,2009).

Según el peso al nacer.

Debe valorarse en relación con la edad gestacional y es adecuado cuando está entre los percentiles 10 y 90. Cuando es inferior al percentil 10, se trata de un recién nacido de bajo peso para su edad gestacional (RNPEG). Genéricamente puede llamarse bajo peso al que tienen menos de 2.500g de peso (BPN) (SVPP ,2009).

Recién nacido de muy bajo peso al nacer: RN de peso inferior a 1.500g y mayor a 1.000g (MBPN).

Recién nacido de peso extremadamente bajo al nacer: RN de peso inferior a 1.000g.

Son tributarios de cuidados muy especiales y su morbimortalidad sigue elevada en niños de peso entre 500-600g, y edad gestacional de 23-34 semanas (SVPP ,2009).

Definición de Términos Básicos

Arginina: es un aminoácido condicionalmente esencial al igual que la glutamina, (porque la capacidad de síntesis endógena no puede cubrir la demanda que ocurre en determinadas situaciones); es clasificado como básico, porque se encuentra cargado positivamente a pH neutro. Este aminoácido participa significativamente en el metabolismo del nitrógeno, sobre todo en el ciclo de la urea (Mataix, 2009).

Citrulina: es un aminoácido que se encuentra libre en el plasma y puede estar presente en otros fluidos fisiológicos, como orina, sudor, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico. La glutamina es el principal precursor de la citrulina plasmática. En humanos sanos, sin insuficiencia renal ni intestinal, las concentraciones de

citrulina sérica varían entre 20 y 60 μ mol/L, con una media de 40 μ mol/L (Teixeira et al, 2009).

Enterocolitis necrotizante: es una enfermedad que afecta fundamentalmente al recién nacido pretérmino (< 38 semanas de gestación y bajo peso al nacer <1500g), se caracteriza por áreas de necrosis en el intestino delgado y grueso, a menudo asociadas a neumatosis de la pared intestinal (Ruza F, 2002).

Nutriente condicionalmente esencial: es un compuesto fisiológicamente indispensable, producido usualmente en cantidades adecuadas por síntesis endógena pero que se requiere de forma exógena bajo determinadas circunstancias (Hernández M & Sastre A, 1999.)

Hiperamonemia: es un trastorno grave del metabolismo debido a la deficiencia de la arginino succinasa y de la ornitina transcarbamilasa que conduce sin tratamiento a una acumulación de amoniaco (NH_4^+) en la sangre (valores normales: en neonatos hasta 150mcg/100ml; en lactantes y niños hasta 80mcg/100ml) (Müller-Esterl W, 2008).

Hipótesis

Comprobar si los niveles séricos de arginina y citrulina en neonatos prematuros se encuentran por debajo de los valores estándares para recién nacidos a término.

Variables

Variable cualitativa dicotómica: género (femenino, masculino) y prematuridad (prematuro moderado, prematuro extremo)

Variable cualitativa politómica: peso al nacer (Peso bajo al nacer, Peso muy bajo al nacer, Peso extremadamente bajo al nacer)

Variables continuas: edad gestacional (número de semanas) y peso al nacer

Variables independientes: género, peso al nacer y edad gestacional

Variables dependientes: arginina y citrulina

Variable interviniente: patologías de los recién nacidos

Criterios de inclusión

Recién nacidos a término:

Edad gestacional (entre las 37 y 42 semanas de gestación)

Peso comprendido entre 2.500g a 4.000g

Sin patologías conocidas

Recién nacidos pretérmino:

Edad gestacional (< 37 semanas de gestación)

Peso comprendido menor a 2.500g

Criterios de exclusión

Recién nacidos a término:

Neonatos postérmino (> 42 semanas de gestación)

Neonatos macrosomicos (> 4.000g)

Neonatos con peso inferior a 2.500

Recién nacidos pretérmino:

Neonatos con peso superior a 2.500g

bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLOGICO

Tipo de investigación

La presente investigación se trató de un estudio observacional ya que en ningún momento hubo manipulación de las variables, solo se estudiaron como se presentaron en su contexto. Descriptivo dado que no se buscó dar la explicación al origen del fenómeno, solo de caracterizar y mostrar lo encontrando. De cohorte transversal por lograr estudiar los hallazgos en un momento dado para cada individuo y no prolongándose en el tiempo el estudio.

Diseño de la Investigación

Fase de obtención de información y muestras: se realizó conforme con los criterios de inclusión y exclusión para los grupos de estudios previamente se procedía a revisar las historias clínicas para poder corroborar que el neonato cumplía con las condiciones para poder ingresar al estudio. Después de identificar al neonato para el caso de los prematuros de bajo peso al nacer se buscaba la muestra de suero sanguíneo en el laboratorio general del I.A.H.U.L.A, tomándose a las 24 horas de

nacimiento, se almacenaba en un eppendorf de 600 μ L, se transportaba bajo refrigeración hasta el laboratorio de fisiología de la conducta de la facultad de medicina y se guardaban bajo congelación a 20 °C.

Para el caso de los neonatos a término de peso adecuado al nacer, existe un gramaje de aspectos éticos que protegen su integridad física y de salud por lo que no se podía tomar muestras sanguíneas provenientes de la circulación central suponiéndose en todo caso que el niño era completamente sano al nacer, de este modo se procedió a tomar muestras del cordón umbilical para poder generar un grupo comparativo de estudio sin tener que aplicar métodos invasivos que pudiesen afectar la salud del neonato. Las muestras se tomaron, transportaron y se almacenaron bajo las mismas condiciones de tiempo, temperatura que se transportaban y almacenaban las muestras de los neonatos prematuros de bajo peso

Fase de procesamiento de muestras y de información: una vez que se tenía toda la información almacenada en una data y las muestras de los neonatos recolectadas bajo congelación se procedían a tratarse. Los protocolos del tratamiento de las muestras y condiciones de las lecturas se especifican a continuación en los próximos párrafos de materiales y métodos de la fase experimental.

Población y Muestra

El objeto de estudio en esta investigación estuvo constituido por una población finita de 59 neonatos de ambos géneros. El muestreo fue no probabilístico de tipo intencional o de conveniencia conformado por dos grupos: el grupo de estudio integrado por 29 neonatos prematuros que residían en el servicio de neonatología “Dr José D’Jesús Avendaño” y el grupo comparativo integrado por 30 neonatos a término que residían en la unidad de bajo riesgo neonatal, ambos servicios pertenecientes al I.A.H.U.L.A. de la ciudad de Mérida, municipio libertador, Estado Mérida. La recolección de las muestras estuvo dada en un lapso de tiempo comprendiendo los meses de noviembre y diciembre del 2014.

bdigital.ula.ve

Instrumento para la Recolección de datos

Para la recolección de la información pertinente se diseñó un formulario que recogía los datos generales: número de asignación a la muestra, nombre y apellido del neonato, fecha de nacimiento y de ingreso al servicio, género, peso al nacer, talla al nacer, edad gestacional, vía de nacimiento y diagnóstico médico para el caso del grupo de estudio (neonatos prematuros).

Materiales y métodos de la fase experimental

Disoluciones

Buffer carbonato: 5 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 0,2 M y 5 mL de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 0,2 M en 90 mL de agua de agua destilada. Resultado: 100 mL de buffer carbonato con una concentración de 20 mM y pH de 10,1. Filtrado a través de nitrocelulosa con poros de 4 micras y desgasificado por 30 min.

Solución derivatizadora: 1 mg de isotiocianato de fluoresceína ($\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$) o FITC del isómero I en 1 mL de acetona y 1 mL de buffer carbonato filtrado y desgasificado. Resultado: 2 mL de solución derivatizadora con una concentración de 1,28 mM de FITC. Filtrado a través de 0,20 μm .

Solución estándar del aminoácido: 1 mg del aminoácido en 1 mL de buffer carbonato filtrado y desgasificado con 5 μL de solución derivatizadora filtrada. Resultado: 1005 mL de solución estándar; almacenado bajo oscuridad por 24h y luego filtrado en 0,20 μm .

Derivatización de la muestra (marcaje con FITC)

La muestra guardada en un eppendorf (600µL) se esperaba a que alcanzara una temperatura ambiente para poder ser tratada. Se procedía a la separación del suero de la muestra biológica, mediante centrifugado a 6000rpm durante 15min. Se tomaba un volumen 20 µL de suero de la muestra biológica y se le añadía 20 µL de acetonitrilo a una relación 1:1 (vol: vol) con el fin de desproteinizar. Posteriormente se centrifugaba con las siguientes condiciones: 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para poder obtener una solución de aminoácidos séricos libre de proteínas. Luego se tomaba 20 µL del sobrenadante (suero sanguíneo desproteinizado) y se le agregaba 20 µL solución derivatizadora filtrada a una relación 1:1 (vol: vol) para marcar. Los eppendorf que contenían las muestras con FITC se guardaban bajo refrigeración protegiéndolos de la luz por 24 horas, de esta manera se aseguraba la reacción del FITC con los grupos amino de los aminoácidos presentes en la solución, una vez transcurrido el tiempo necesario se hacían pasar las muestras por el equipo de EC para posterior lectura del electroferograma.

Electroforesis capilar (EC)

La electroforesis capilar se realizó en un equipo model R2D2 automático fabricado por Meridiálisis CA en Mérida, Venezuela. El equipo poseía un capilar de sílica

fundida con una cubierta de poliamida de 75 cms de longitud, 355 mm de diámetro externo y 25 mm de diámetro interno, los extremos se encontraban inmersos en reservorios con buffer carbonato 20 mM equipados con electrodos de platino-iridio, Estos estaban conectados a una fuente de poder que generaba 26 KV.

El equipo se preparaba antes de realizar alguna lectura lavando con: hidróxido de sodio (NaOH) filtrado al 1 M por 6 minutos, luego con agua desionizada filtrada con 18 MW por 6 minutos y por último con buffer carbonato previamente filtrado y desgasificado al 20 mM por 6 minutos. Los estándares de aminoácidos y las muestras derivatizadas eran inyectadas hidroareodinamicamente por el extremo anódico del capilar mediante la aplicación de una presión negativa de 13 p.s.i por 1seg en el extremo catódico del capilar. La muestra se corría durante 25 minutos para poder tener un electroferograma de alta calidad.

Después de separadas las sustancias por fuerza electrosmotica y electroforética eran detectadas en un detector colineal que recibía un rayo láser de 488 nm y 10 mW de potencia emanado de un tubo de ion argón. El láser es conducido al detector mediante una fibra óptica, es desviado hacia un objetivo de apertura numérica alta mediante un espejo dicroico centrado a 505 nm. La fluorescencia es recogida por el mismo objetivo, atraviesa el espejo dicroico y es concentrada, mediante un ocular, en la ventana fotosensible de un tubo fotomultiplicador. La señal del tubo fotomultiplicador es alimentada en un computador equipado con el software CZE - 2.

Identificación de analitos o “spiking”

Por medio del electroferograma de cada muestra se identificaba la presencia de los aminoácidos arginina y citrulina por el tiempo de aparición y por la altura de la espiga o pico. La certeza de que fuera el aminoácido de interés se comprobada de la siguiente manera: después de haber corrido la muestra problema obteniendo un primer electroferograma y acondicionado el equipo nuevamente para volver a hacer otra corrida, se combinaba la muestra (inyección de 1 segundo) con una solución patrón de concentración conocida de los aminoácidos en estudio (inyección de 1,2 segundos), se hace correr la muestra con la solución estándar. Al obtener el segundo electroferograma se solapaban ambos electroferogramas para constatar que el pico que crecía en el segundo electroferograma comparado con el primer electroferograma era correspondiente al aminoácido de importancia.

Este proceso era dado partiendo que una muestra tiene una concentración de una sustancia X que se desea conocer (para el presente caso la solución de aminoácidos séricos), esta última cuando se mezcla con una solución patrón a una concentración conocida de la sustancia todos los demás analitos presentes en la matriz disminuyen su concentración y aumenta aquella sustancia que se le está agregando en mayor proporción. Por tanto como los analitos tienen un tiempo de migración muy similar

por su comportamiento molecular y de cargas se podía ubicar la exactitud de la espiga del aminoácido de interés en el electroferograma correspondiente solo a la muestra.

Análisis de los electroferogramas y conversión a unidades

El programa CZE – 2 guardaba los electroferogramas de cada muestra. Al tener el pool de electroferogramas se proyectaban en un programa llamado Lector CRM que se abría dentro del software matemático MATLAB. Los electroferogramas se emitían en unidades de intensidad de fluoresceína (mV) y de tiempo (seg), respectivamente el tiempo para el eje X y la intensidad para el eje Y dentro un plano de representación. En el programa lector CRM se podía cuantificar la altura de la espiga midiendo desde el punto de partida al punto de finalización generando una línea base y esta a su vez media la distancia que había desde la línea base hasta el punto máximo de crecimiento en el pico correspondientes a los complejos FITC – arginina y FITC – citrulina. A Partir de valores emitidos de intensidad se llevaban a la ecuación correspondiente para ser transformados en unidades séricas.

$$\text{Aminoácido } \mu\text{M: } (A/S) * \text{CSTD} * \text{FD}$$

Dónde:

A: Intensidad de la altura de la muestra

S: Intensidad de la altura del estándar

CSTD: Concentración del estándar

FD: Factor de dilución

Análisis y procesamiento de datos

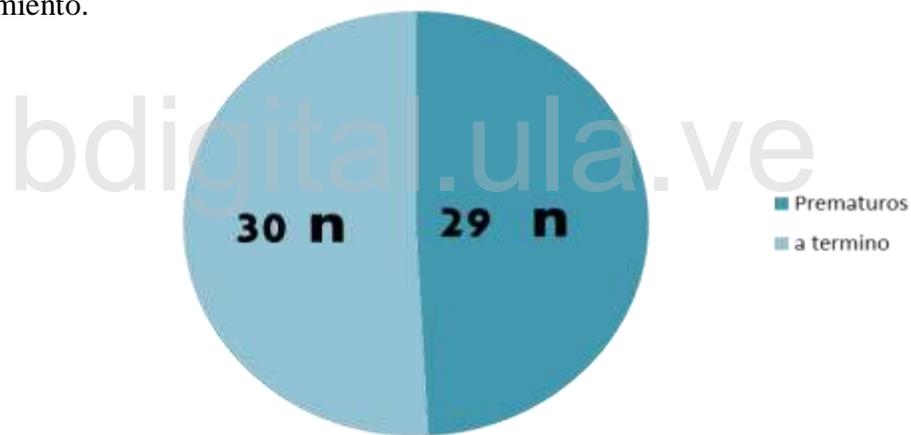
Se construyó una matriz de valores en el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 15.0. Se usaron variables de orden cuantitativo para obtener valores de tendencia central, así como para ver la relación de los niveles séricos de arginina y citrulina en ambos grupos de estudio con sus variables se comprobó a través de una matriz de correlación, análisis de varianza y análisis de regresión lineal simple para observar la relación de cada variable dependiente con variables independientes. Para la construcción de gráficos se utilizó la misma matriz de valores pero en Office Excel 2010.

bdigital.ula.ve

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Figura 1. Distribución de los neonatos pertenecientes al estudio según la condición de nacimiento.



Fuente: Ficha de datos. Servicio de neonatología “Dr. José D’Jesus Avendaño” y servicio de Sala de parto del I.A.H.U.L.A. Mérida, Estado Mérida.

En la figura 1 se presenta la distribución de la muestra de recién nacidos para el grupo de estudio y el grupo comparativo. Encontrándose que se contó con 30

neonatos a término con adecuado peso al nacer y 29 neonatos prematuros de bajo peso al nacer.

Tabla 1. Distribución por género de los neonatos prematuros y a término

Condición de nacimiento	Género				Total	
	Masculino		Femenino		N	%
	Nº	%	Nº	%		
Prematuros	18	30,51	11	18,64	29	49,15
A termino	18	30,51	12	20,34	30	50,85
Total	36	61,02	23	38,98	59	100

Fuente: Ficha de datos. Servicio de neonatología “Dr. José D’Jesus Avendaño” y servicio de Sala de parto del I.A.H.U.L.A. Mérida, Estado Mérida.

Al observar la tabla puede encontrarse la distribución por género que se encontró en el número de nacimientos para cada grupo de estudio. Predomino el género masculino en un 61,02% de mismas proporciones para cada grupo de estudio. Mientras que el género femenino solo ocupó un 38,98% de parte de la muestra, siendo el 20,34% para el grupo de los neonatos a término de adecuado peso al nacer y 18,64% para el grupo de neonatos pretermino de bajo peso al nacer.

Tabla 2. Distribución según niveles de prematuridad por edad gestacional (EG).

Nivel de prematuridad Según EG	Prematuros	
	Nº	%
Prematuros moderados	24	82,80
Prematuros extremos	5	17,20
Total	29	100

Fuente: Ficha de datos. Servicio de neonatología “Dr. José D’Jesus Avendaño” y servicio de Sala de parto del I.A.H.U.L.A. Mérida, Estado Mérida.

La presente tabla muestra la clasificación del estado del recién nacido según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2009) definida por edad gestacional, en donde se observa que 24 neonatos son prematuros moderados siendo estos de edad gestacional comprendida entre 31 a 36 semanas de gestación y 5 neonatos son prematuros extremos entre 28 y 30 semanas de gestación.

Tabla 3. Distribución según peso al nacer (PA) en los neonatos prematuros.

Peso al nacer Clasificación para prematuros	Prematuros	
	Nº	%
Peso bajo al nacer	15	51,7
Peso muy bajo al nacer	12	41,4
Peso extremadamente bajo al nacer	2	6,9
Total	29	100

Fuente: Ficha de datos. Servicio de neonatología “Dr. José D’Jesus Avendaño” y servicio de Sala de parto del I.A.H.U.L.A. Mérida, Estado Mérida.

La tabla 3 presenta la clasificación del estado del recién nacido definida por peso al nacer (OMS, 2009). Siendo de peso bajo al nacer aquellos neonatos que pesaron menos de 2500g observándose 15 recién nacidos para esa categoría; de peso muy bajo al nacer aquellos de 1000-1500g representado por 12 neonatos y peso extremadamente bajo aquellos inferior a 1000g existiendo 2 prematuros en dicha clasificación.

Tabla 4. Descriptivos de las variables antropométricas y obstétricas de los neonatos

Variables		\bar{X}	σ	Min – Max
Pretérmino	Peso (g)	1583,2	445,4	870 – 2350
	Talla (cm)	40,39	4,0	33 – 47
	Edad gestacional (semanas)	32,3	2,5	27 – 36
A término	Peso (g)	3053,3	333	2500 – 3800
	Talla (cm)	48,7	3,1	36 – 52
	Edad gestacional (semanas)	38,6	1,1	37 – 41

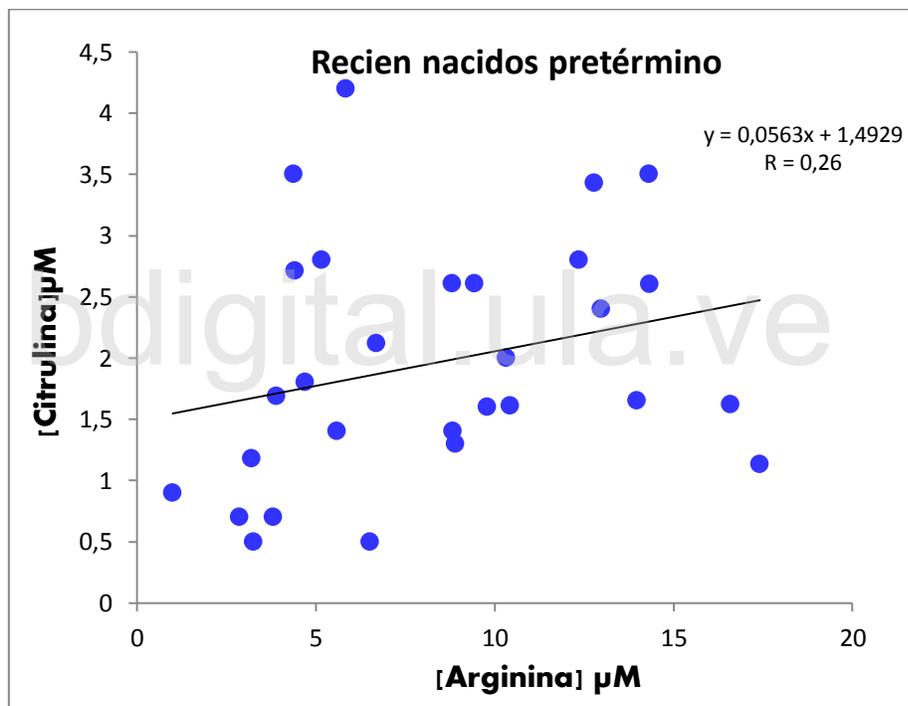
Fuente: Ficha de datos. Servicio de neonatología “Dr. José D’Jesus Avendaño” y servicio de Sala de parto del I.A.H.U.L.A. Mérida, Estado Mérida.

En la tabla 4 se observan las variables antropométricas; peso, talla, y edad gestacional caracterizadas por diagnóstico nutricional, presentando las esperadas diferencias significativas en todas las variables antropométricas entre el grupo de prematuros y de neonatos a término así como también algunas medidas de tendencia central. La media aritmética del peso para el grupo de recién nacidos pretérmino es de 1583 g presentando desviación estándar de 445gramos en la distribución respecto a la media; es de notar que el peso mínimo encontrado es 870gramos, un promedio de

40,39 centímetros y una desviación de solo 4centímetros; la mayoría de los prematuros mostraban una edad gestacional alrededor de las 32 semanas.

En cuanto a los recién nacidos a término el comportamiento de los valores antropométricos son distintos siendo el promedio del peso encontrado 3053 g la talla de 48,7 centímetros y la edad gestacional de 38,6 semanas.

Figura 2. Relación arginina citrulina en los recién nacidos pretérmino.

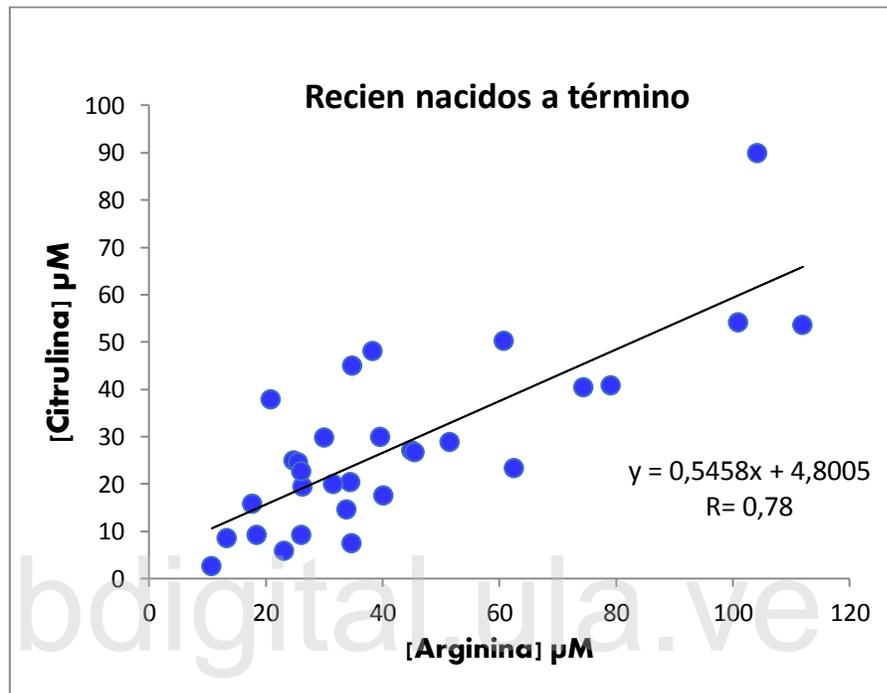


Fuente: electroferogramas. Software Lector CRM. Laboratorio de fisiología de la conducta “Eduardo Briese”, Facultad de medicina, Mérida – Estado Mérida.

En el presente diagrama de dispersión o Scattergrama la correlación entre ambas variables es nula (porque R es cercano a 0). No se cumple en los neonatos prematuros que las concentraciones micromolares (μM) de Citrulina correspondan a

su vez al aminoácido Arginina, el crecimiento de ambas no es proporcional es decir, las variables no están correlacionadas en este grupo de estudio.

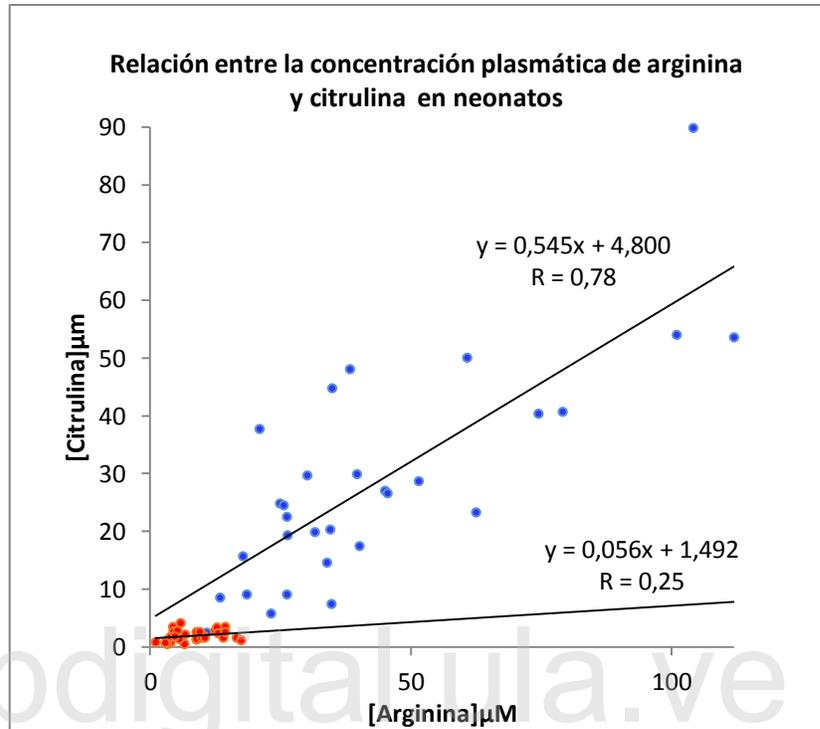
Figura 3. Relación arginina citrulina en los recién nacidos a término.



Fuente: electroferogramas. Software Lector CRM. Laboratorio de fisiología de la conducta “Eduardo Briese”, Facultad de medicina, Mérida – Estado Mérida.

El diagrama muestra una fuerte correlación positiva o lo que se conoce también como una correlación alta y directa. Es alta porque R da mayor de 0,70 ($y = 0,5458x + 4,8005R = 0,78$); directa porque al crecer, crece Y en la misma proporción. Así bien las concentraciones de arginina y citrulina en los recién nacidos a términos; conforme aumentaba la concentración de arginina también aumentaban las de citrulina.

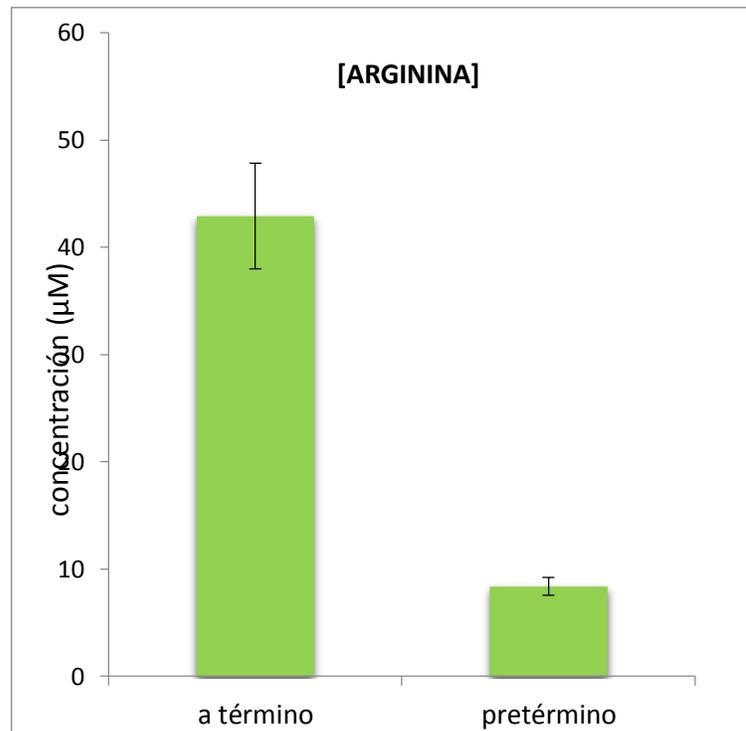
Figura 4. Relación entre la concentración plasmática de arginina y citrulina en neonatos a término y prematuros



Fuente: electroferogramas. Software Lector CRM. Laboratorio de fisiología de la conducta “Eduardo Briese”, Facultad de medicina, Mérida – Estado Mérida.

Es de observarse en el diagrama las correlaciones entre concentraciones de aminoácidos (citrulina y arginina) de ambos grupos de neonatos; se apreciar la proporcionalidad que parece existir entre los aminoácidos en los neonatos a términos; no es igual a la de los prematuros en donde cualquier valor para la variable X (concentración de arginina), Y (concentración de citrulina) puede tener cualquier valor; no aparece para los prematuros relación especial entra ambas variables.

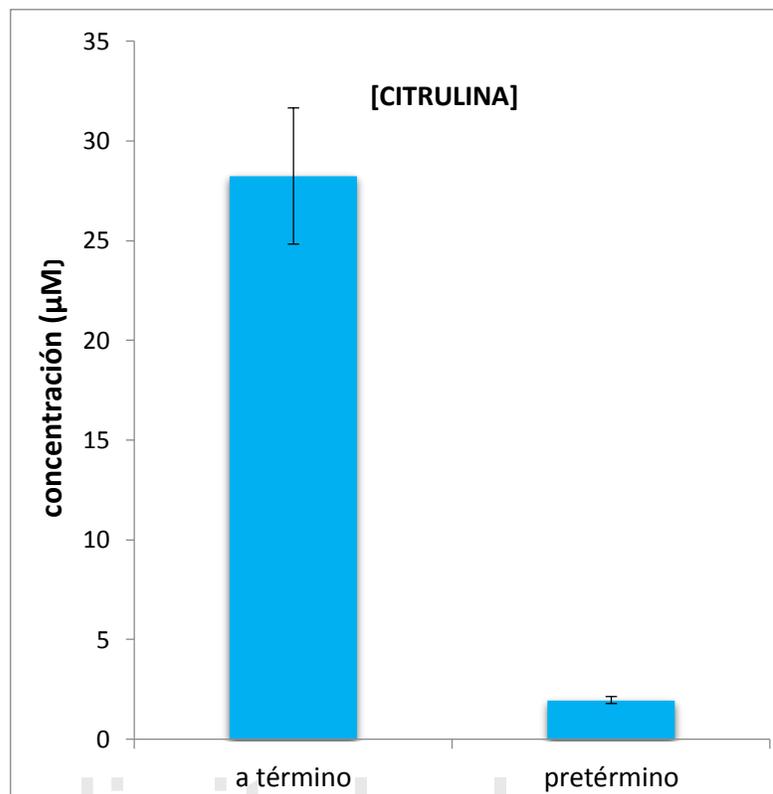
Figura 5. Niveles séricos de arginina en neonatos: grupo de estudio vs grupo comparativo.



Fuente: electroferogramas. Software Lector CRM. Laboratorio de fisiología de la conducta "Eduardo Briese", Facultad de medicina, Mérida – Estado Mérida.

En la gráfica de barras se evidencia concentraciones del aminoácido arginina mucho más elevadas en recién nacidos a término en comparación a recién nacidos pretérmino.

Figura 6. Niveles séricos de citrulina en neonatos: grupo de estudio vs grupo comparativo.



Fuente: electroferogramas. Software Lector CRM. Laboratorio de fisiología de la conducta “Eduardo Briese”, Facultad de medicina, Mérida – Estado Mérida.

En la gráfica de barras describe los niveles del aminoácido citrulina para los grupos de neonatos. Se puede apreciar niveles de concentraciones micromolares mucho más elevadas para los recién nacidos a término, que para el grupo de prematuros.

Tabla 5. Relación de las concentraciones plasmáticas de la arginina y citrulina con variables perinatales de nacimiento en neonatos a término y prematuros.

Variables metabólicas	Variables perinatales		
	comportamiento	Peso al nacer (PAN) g	Edad gestacional (EG) semanas
Neonatos Prematuros			
Arginina (μM)	↑	0,005	0,257
Citrulina (μM)	↑	0,001	0,060
Neonatos a término			
Arginina (μM)	↑	0,014	1,107
Citrulina (μM)	↑	0,009	0,732

Fuente: electroferogramas. Software Lector CRM. Laboratorio de fisiología de la conducta “Eduardo Briese”, Facultad de medicina, Mérida – Estado Mérida.

bdigital.ula.ve

En la tabla 5 se puede observar el comportamiento de los aminoácidos arginina y citrulina de acuerdo a las variables antropométricas y obstétricas al momento de nacimiento que presentaron los neonatos que formaron parte del estudio. Para los neonatos prematuros la arginina aumenta 0,005 μM por cada gramo de peso y 0,257 μM por cada semana de edad gestacional. Para la citrulina se observa que por cada gramo de peso aumenta dicho producto metabólico en 0,001 μM y que por cada semana de edad gestacional que avance aumenta 0,060 μM .

Mientras que para los recién nacidos a término la arginina aumenta por cada gramo de peso en 0,014 μM y 1,107 μM por cada semana de edad gestacional. En

cuanto a la citrulina se observó el incremento de 0,009 μM por cada gramo de peso y por cada semana gestacional que transcurra aumenta 0,732 μM .

Discusión de resultados

Los aminoácidos constituyen un importante nutriente fetal. No sólo son requeridos por el feto para la síntesis de proteínas sino que también son metabolizados por él. Los aminoácidos proporcionan entre el 20 y el 40% de la energía requerida por la unidad fetoplacentaria. El turnover de proteínas se ha descrito que se incrementa en gestaciones normales un 15% en el segundo trimestre y un 25% en el tercer trimestre, comparado con una mujer no gestante. Existen entre 15 y 20 sistemas de transporte de aminoácidos en la placenta humana, con especificidades de sustrato solapadas y distinta localización en la membrana apical y/o basal del trofoblasto (Serrano, 2009).

La concentración fetal de aminoácidos es superior a la concentración materna. Para la mayor parte de los aminoácidos hay una transferencia neta de la madre al feto, excepto para el aspartato y el glutamato. Los niveles circulantes de aminoácidos en sangre materna también juegan un papel principal influyendo en la capacidad del transporte de aminoácidos y, en último término, determinando el suministro al feto de aminoácidos (Serrano, 2009).

Hace ya mucho tiempo que se admitió que los requerimientos de arginina pueden alterarse en ciertas enfermedades. Así, en algunos defectos congénitos de enzimas del

ciclo de la urea, la arginina es un aminoácido esencial. Es evidente por su posición en el ciclo de la urea que la arginina puede sintetizarse fácilmente. Por otra parte, las soluciones de nutrición parenteral exentas de arginina causan hiperamonemia, acidosis metabólica y coma en la especie humana. Además, la síntesis de arginina está disminuida en los recién nacidos, especialmente en los prematuros, debido a que varias enzimas del ciclo de la urea maduran alrededor del nacimiento.

La pre-eclampsia es una de las causas fundamentales de retraso del crecimiento intrauterino, de prematuridad y de comorbilidad asociada. La infusión de 30 g de arginina a mujeres con pre-eclampsia aumenta la producción sistémica de óxido nítrico (NO) y reduce la presión arterial. Por otra parte, se sabe que el NO inhibe la contractilidad uterina durante la gestación. La infusión de 30 g de arginina durante 30 minutos a mujeres con contracciones prematuras reduce espontáneamente la contractilidad. Todo ello sugiere que la arginina puede ser útil en la prevención de la prematuridad (Fontana, Sáez, Santisteban & Gil, 2006).

La arginina es un aminoácido semiesencial, su síntesis se realiza fundamentalmente en el riñón a partir de la citrulina procedente del intestino y de un donante de nitrógeno, que habitualmente es el ácido aspártico. En donde se produce una síntesis del 40% a nivel intestinal por fuentes alimenticias antes de alcanzar la circulación portal, el turnover de las proteínas corporales (representa aproximadamente el 85% de la arginina circulante) y la vía endógena de síntesis de novo.

Teniendo en cuenta que existe una síntesis de novo, nos podríamos preguntar el porqué de su semiesencialidad en el ser humano. Las situaciones de estrés, infecciones y la prematuridad, son las 3 situaciones que requieren aportes extras de arginina y le convierten en un aminoácido semiesencial (Román, Fuente & Jáuregui, 2009).

Si nos enfocamos en la tercera situación mencionada y es en donde se basa la presente investigación como es el caso de la arginina en prematuros; fuentes bibliográficas describen que la síntesis de novo en el feto ocurre en el enterocito, sin embargo la expresión del gen que produce la enzima fetal argininosuccinato sintetasa y argininosuccinato liasa es baja, requiriendo el influjo positivo del cortisol de niño, el cual no alcanza suficientes niveles en los prematuros (Román, Fuente & Jáuregui, 2009).

Durante el periodo de lactancia, la mayor fuente de arginina es la biosíntesis intestinal a partir de la citrulina. A medida que pasan los meses, la actividad de estos dos enzimas (argininosuccinato sintetasa y argininosuccinato liasa) disminuye hasta hacerse indetectable a nivel intestinal. En este momento existe una transición a la vía (eje riñón-intestino), en el cual la citrulina es producida en las células epiteliales del intestino delgado, a partir de la glutamina y el glutamato. Esta citrulina es secretada al torrente sanguíneo y el riñón extrae esta citrulina del torrente sanguíneo produciendo

arginina a nivel del túbulo proximal. Por otra parte la secuencia de la conversión de ornitina a citrulina y a arginina no ocurre en el eje riñón-intestino, sino en el ciclo de la urea (Román, Fuente & Jáuregui, 2009).

Se evidencia en este estudio concentraciones del aminoácido arginina mucho más elevadas en recién nacidos a término (\bar{X} 42,92 μM) en comparación a recién nacidos pretérmino (\bar{X} 8,36 μM) lo cual se puede deber a que el desarrollo de la mucosa intestinal son inmaduros aún más para los prematuros; así mismo como se mencionó anteriormente la síntesis principal de arginina se realiza por el ciclo de la urea a partir de la citrulina procedente del intestino lo cual también es baja, es de tener en cuenta que en los recién nacidos existe un cierto grado de déficit de actividad de dos enzimas arginosuccinato sintetasa y arginasa en el ciclo de la urea que pueden repercutir en que los mismo niveles de arginina y citrulina sean bajos.

En la primera época de la vida el neonato presenta una deficiencia de enzimas implicadas en el catabolismo de determinados aminoácidos, los cuales pueden producir efectos deletéreos, especialmente dada su gravedad a nivel del sistema nervioso central, que está en período de desarrollo y maduración (Mataix, 2009).

El intestino delgado es responsable, no sólo de la digestión y la absorción de los nutrientes, sino también del metabolismo de varios aminoácidos, entre ellos, la glutamina, principal precursor de la citrulina plasmática. El enterocito ejerce una

función decisiva en el catabolismo de los aminoácidos de la dieta en el primer paso por el yeyuno. Estos substratos, al contrario de la glucosa, se consideran combustibles para la mucosa intestinal y algunos son precursores esenciales en la síntesis de otros aminoácidos, entre ellos, la citrulina (Teixeira et al, 2009).

Aproximadamente, 100% de la citrulina plasmática es liberada por los enterocitos en la circulación portal por medio del metabolismo de la glutamina, principalmente en la región apical de las vellosidades. No es absorbida por los hepatocitos y llega intacta a los tejidos periféricos. Esta característica es fundamental para la síntesis de proteínas en situaciones de estrés metabólico, como sepsis, estado postoperatorio y pancreatitis aguda, y para la formación de la arginina en los riñones, principal precursora del óxido nítrico, componente importante en la respuesta y presencia sostenida del sistema inmunológico, regulación del flujo sanguíneo y cicatrización de heridas (Teixeira et al, 2009).

La citrulina se encuentra como aminoácido libre en el plasma y puede estar presente en otros fluidos fisiológicos, como orina, sudor, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico. También presenta funciones que difieren entre las diversas especies. En humanos sanos, sin insuficiencia renal ni intestinal, las concentraciones de citrulina sérica varían entre 20 y 60 $\mu\text{mol/L}$, con una media de 40 $\mu\text{mol/L}$.

La distribución tisular del metabolismo de la citrulina involucra, especialmente, el intestino delgado, el hígado y los riñones, con tres importantes reacciones químicas: transformación intrahepática de amoníaco en urea, síntesis de la arginina a partir de la glutamina en el intestino y en los riñones, y síntesis del óxido nítrico.

En el hígado, la citrulina es un metabolito intermediario que interviene en el ciclo de la urea. Ésta es una vía metabólica no relacionada con otras vías, porque toda la citrulina sintetizada en la mitocondria del hepatocito es convertida en el citoplasma en otros productos del ciclo de la urea, sin que exista ninguna liberación a la circulación sanguínea.

En el intestino, principalmente en el yeyuno, la glutamina proveniente de la alimentación (66%) o de la sangre arterial que irriga los tejidos periféricos como el sistema músculo-esquelético (33%), es absorbida y metabolizada, produciéndose la mayoría de la citrulina circulante. Mediante el catabolismo, aproximadamente 83% de la citrulina plasmática se convierte en arginina, precursora esencial del óxido nítrico, en los túbulos renales proximales.

Se determinaron niveles de concentraciones del aminoácido citrulina para los grupos de neonatos. En donde se puede apreciar niveles de concentraciones micromolares mucho más elevadas para los recién nacidos a término con una media (\bar{X} 28,22 μM) que para el grupo de prematuros (\bar{X} 1,96 μM).

En cuanto a la relación de arginina con citrulina encontradas para los dos grupos de estudio; los recién nacidos a término con alta concentración de arginina tienen niveles más bajos de citrulina mostrándose directamente proporcionales en comparación con los recién nacidos prematuros que tenían bajo nivel de arginina cuyo nivel de citrulina fue más bajo aun (es decir, no se encontraron directamente proporcionales) así cualquier valor para la variable arginina, las concentraciones de citrulina puede tener cualquier valor; no aparece relación especial entre ambos aminoácidos.

En un artículo de revisión en el 2009; explican las situaciones en las que aumenta y disminuye la citrulina en el organismo humano; entre ellas describe las enfermedades de las microvellosidades como por ejemplo la enfermedad celíaca, el esprúe tropical y las enteritis bacterianas. Estas enfermedades comprometen, principalmente, el yeyuno proximal, donde ocurre la mayor producción de citrulina. Otras condiciones asociadas con atrofia de las vellosidades incluyen los síndromes de inmunodeficiencia primario o secundario, el esprúe resistente al tratamiento y el linfoma de células T. De la misma manera, en enteropatías agudas que llevan a una importante pérdida de enterocitos, como la enteritis por adenovirus, la citrulinemia puede estar reducida, pero rápidamente vuelve a los niveles normales después de 1 a 3 semanas.

Por otra parte indican que puede haber aumento de citrulina cuando ocurre aumento de la producción o disminución en la utilización. En el primero, puede ser provocada por el aumento de la producción intestinal por disminución de la ingestión proteínica, y el segundo corresponde a la disminución de la depuración en la orina en casos de insuficiencia renal.

Deficiencias enzimáticas heredadas - argininasuccinato sintetasa (ASS), argininasuccinato liasa (ASL), arginasa carboxilasa de piruvato. Llevan a un perjuicio de la transformación de urea o arginina.

En los casos de la deficiencia en argininosuccinato sintetasa o citrulinemia se hereda con carácter autosómico recesivo, y conduce a la elevación de los niveles de citrulina en sangre y a su excreción por la orina. Las manifestaciones clínicas varían desde las formas graves (retraso mental y muerte) a la ausencia de síntomas, aunque el retraso mental ligero a moderado es una secuela frecuente.

En la deficiencia en argininosuccinato liasa se hereda con carácter autosómico recesivo. En la forma grave se produce intensa hiperamonemia neonatal que puede llevar a la muerte; en la forma subaguda se produce retraso mental, vómito y hepatomegalia. Todos los síntomas son consecuencia de la elevación de los niveles de argininosuccinato en plasma y líquido cefalorraquídeo.

Una forma de tratamiento de estas deficiencias es la restricción de las proteínas de la dieta junto con la administración de suplementos de arginina, cuya función es formar citrulina o argininosuccinatos, que puede ser excretado por la orina, y con ello se elimina nitrógeno; y además la arginina se utiliza para la síntesis de proteínas y de creatinina.

La deficiencia en arginasa produce hiperargininemia, una patología muy poco frecuente, que se hereda con carácter autosómico recesivo, en la que se produce cuadriplejía espástica y retraso mental. Los niveles de arginina están elevados en plasma y líquido cefalorraquídeo, así mismo los niveles de arginina, lisina y ornitina están elevados en orina, pero no suele haber episodios de hiperamonemia intensa. El tratamiento incluye una dieta baja en proteínas excluye la arginina (Garrido & Tejjón, 2006).

Síndrome de la triple H (hiperornitinemia, hiperamonemia y homocitrulinuria). Se caracteriza por aumento plasmático de ornitina y amoníaco y presencia de homocitrulina en la orina, y ocurre debido a una disfunción del intercambio mitocondrial ornitina-citrulina. En pacientes con el síndrome de las HHH presentan niveles elevados de enzimas hepáticas, así como hiperalaninemia, acidemia láctica con un lactato elevado a piruvato, y aumento de la excreción urinaria de lactato, glutarato e intermediarios del ciclo de Krebs. Estos hallazgos son indicativos de disfunción mitocondrial y están de acuerdo con estudios ultra estructurales que muestran un mayor número de grandes y extrañas mitocondrias en el hígado, los

músculos, los leucocitos y fibroblastos de algunos pacientes HHH. Las manifestaciones hepáticas y neurológicas son características de algunos trastornos mitocondriales primarias. Disfunción mitocondrial secundaria puede contribuir a la patogénesis de estas mismas características en el síndrome de HHH (Korman, et al 2004).

Además la disminución de citrulina señala que está relacionada con un defecto en la síntesis intestinal, que puede derivarse de una significativa reducción de la masa de enterocitos, como ya fue descrito, o de una deficiencia de las enzimas mitocondriales del ciclo de la urea: sintasa de N-acetilglutamato, sintetasa de carbamoilfosfato y transferasa de ornitinacarbamoilo.

La Deficiencia de sintasa de Δ^1 pirrolina-5- carboxilato. Conlleva a un defecto de la síntesis de ornitina y consecuente disminución de citrulina y arginina, con un aumento del amoníaco.

El estrés metabólico grave. Está asociado a la disminución de los niveles de citrulina, como ocurre en la pancreatitis aguda y la sepsis, por disminución de la glutamina o de la actividad de la glutamina. Los niveles de citrulina no se alteran en situaciones de desnutrición grave (Teixeira et al, 2009).

No obstante también existen situaciones en las que la arginina también se ve alterada como la cistinuria y la intolerancia proteica lisinurica. La primera es un trastorno autosómico recesivo secundario a un defecto de la proteína D2H o rBAT

human, responsable del transporte renal y gastrointestinal de cistina, lisina, arginina y ornitina. La segunda conocida como la IPL (intolerancia proteica lisinurica), aminoaciduria hiperdibásica de tipo 2, es un trastorno también autosómico recesivo secundario a un defecto del transporte basolateral de los aminoácidos catiónicos lisina, arginina y ornitina en los túbulos renales y el tracto gastrointestinal. Un gen presuntamente responsable de la IPL, el ATRC1, el cual codifica un transportador de aminoácidos catiónicos, ha sido mapeado en el cromosoma 13.

La mayoría de los neonatos alimentados con leche materna son asintomáticos, aunque algunos pueden desarrollar síntomas de hiperamonemia durante el periodo neonatal. En el curso de la semana posterior al destete o durante un aumento de la ingesta proteica, la mayoría de los niños afectados por este trastorno presentan un cuadro de náuseas, vómitos y diarrea leve. Más tarde, estos pacientes padecen trastornos de la alimentación, retardo del crecimiento, hipotonía severa, hepatoesplenomegalia, osteoporosis y un retraso evolutivo. Algunos pacientes presentan un cuadro de infiltración pulmonar intersticial, proteinosis alveolar o un compromiso renal severo con lesiones glomerulares y tubulares que progresa rápidamente hacia un IRC. El diagnóstico se establece por una lisinuria pronunciada, en contraste con un aumento leve de la excreción urinaria de ornitina y arginina. Otros hallazgos en niveles plasmáticos anormales de aminoácidos (Avery, Fletcher, & MacDonald, 2001).

Entre tanto las variables perinatales como la edad gestacional, peso y talla al nacer se encontró en los resultados del presente estudio aumentos pequeños pero progresivos de los niveles séricos de ambos aminoácidos para ambos grupos de población estudiada. Así mismo una investigación en el año 2012 en Grecia donde relacionaron niveles de citrulina plasmática en los recién nacidos prematuros con enterocolitis necrotizante sus resultados revelaron también un aumento progresivo de las concentraciones de citrulina en relación con la edad gestacional; y desde luego significativamente más bajos en comparación con los niveles de citrulina de su grupo control.

No obstante en el 2014 un estudio sobre metabolismo en la prematuridad: análisis de los patrones de aminoácidos, enzimas y marcadores endocrinos por categorías de edad gestacional. Identificaron que los analitos son los más afectados por el grado de prematuridad y podría dar una idea de cómo la prematuridad impacta en el metabolismo examinando las asociaciones entre el grado de prematuridad y los niveles de aminoácidos, enzimas y marcadores endocrinos en todos los recién nacidos con y sin ajuste para el peso al nacer, la alimentación de estado, sincronización de la muestra, la transfusión, y el sexo. Los niveles de tres aminoácidos (arginina, leucina y valina) eran al menos el 50% diferente entre las cohortes de niños extremadamente prematuros y a término. Los niveles de 17-hidroxiprogesterona se incrementaron con el aumento de la prematuridad, mientras que los valores de la hormona estimulante de la tirotropina disminuyeron sistemáticamente con el aumento de la prematuridad. Ninguno de los tres marcadores enzimáticos que examinamos mostró

una tendencia en los niveles en todas las categorías de la prematuridad. Este estudio demuestra que los niños en diferentes etapas de la prematuridad son metabólicamente distintos.

bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Se contó con 30 neonatos a término con adecuado peso al nacer y 29 neonatos prematuros de bajo peso al nacer.
- Predomino el género masculino en un 61,02% de mismas proporciones para cada grupo de estudio. Mientras que el género femenino solo ocupó un 38,98% de parte de la muestra.
- La media aritmética del peso para el grupo de recién nacidos pretérmino es de 1583 g, la mayoría de los prematuros mostraban una edad gestacional alrededor de las 32 semanas. En cuanto a los recién nacidos a término el comportamiento de los valores antropométricos son distintos siendo el promedio del peso encontrado 3053 g y la edad gestacional de 38,6 semanas.
- Las concentraciones de arginina y citrulina en los recién nacidos a término de adecuado peso al nacer conforme aumentaba la concentración de arginina también aumentaban las de citrulina.

- En los neonatos prematuros que las concentraciones de Citrulina y Arginina el crecimiento de ambas no es proporcional.
- Las concentraciones del aminoácido arginina está mucho más elevada en recién nacidos a término de adecuado peso al nacer en comparación a los recién nacidos pretérmino de bajo peso al nacer.
- Las concentraciones del aminoácido citrulina está mucho más elevada en recién nacidos a término de adecuado peso al nacer en comparación a los recién nacidos pretérmino de bajo peso al nacer.
- Para los neonatos prematuros la arginina aumenta 0,005 μM por cada gramo de peso y 0,257 μM por cada semana de edad gestacional. Para la citrulina se observa que por cada gramo de peso aumenta dicho producto metabólico en 0,001 μM y que por cada semana de edad gestacional que avance aumenta 0,060 μM .
- Mientras que para los recién nacidos a término la arginina aumenta por cada gramo de peso en 0,014 μM y 1,107 μM por cada semana de edad gestacional. En cuanto a la citrulina se observó el incremento de 0,009 μM por cada gramo de peso y por cada semana gestacional que transcurra aumenta 0,732 μM .

Recomendaciones

Cualquier biomarcador de uso en la práctica clínica en el tiempo han creado valores estándares y de referencia incluso por poblaciones, razas, ubicación geográfica y entre otros. Varios países de Latinoamérica y de otros continentes han creado valores de referencia para niveles plasmáticos de aminoácidos en grupos tan vulnerables como lo son los lactantes menores, mayores y niños. Es necesario crear valores referenciales de niveles plasmáticos y séricos de aminoácidos para estos grupos vulnerables, de esta forma se puede observar que tan normal se comporta la población y ayudaría al diagnóstico precoz de diversas patologías en especial las orden genético y errores innatos del metabolismo.

El adecuado pronóstico nutricional metabólico del prematuro se realiza a través de biomarcadores, el uso de la arginina y citrulina sérica como posible futuro biomarcador en el seguimiento nutricional puede aportar más indicios de las decisiones a tomar acerca del suministro de nutrientes para poder reducir los estragos de las injurias patológicas presentes.

El aminoácido arginina está implicado en múltiples procesos metabólicos que están encargados de eliminar metabolitos tóxicos. Para poder tener un mejor panorama del metabolismo de la arginina en el neonato es conveniente poder

determinar el dosaje de los aminoácidos precursores (glutamina y prolina), precursores metabólicos (ornitina y citrulina) y poliaminas (putrescina y agmatina).

bdigital.ula.ve

BIBLIOGRAFIA

Avery G, Fletcher M, & MacDonald M (2001). *Neonatología: fisiopatología y manejo del recién nacido* (5ª edición) Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Becker, R., Wu, G., Galanko, J., Chen, W., Maynor, A., Bose, C. et al (2000).
Reduced Serum Amino Acid Concentrations in Infants with Necrotizing
Enterocolitis. *J Pediatr*. Extraído el 25 octubre 2014 en:
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reduced+Serum+Amino+Acid+
Concentrations+in+Infants+with+Necrotizing+Enterocolitis](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reduced+Serum+Amino+Acid+Concentrations+in+Infants+with+Necrotizing+Enterocolitis).

CANIA (2009). *Nutrición en Pediatría Tomo I*. (2da ed). Caracas: Empresas Polar.

Castagnino, J. (2000). Electroforesis Capilar. *Bioquímica*. Extraído el 25 octubre
2014 en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57611797003>.

Celik, I., Demirel, G., Canpolat, F. & Dilmen, T. (2013). Reduced plasma citrulline
levels in low birth weight infants with necrotizing enterocolitis. *Journal of
Clinical Laboratory*. Extraído el 05 noviembre 2014, En:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.21607/abstract>.

Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (2011). Indicadores Básicos de Venezuela. Extraído el 25 de octubre del 2014, en: http://www.unicef.org/venezuela/spanish/overview_13275.htm.

Fontana, L., Sáez, M., Santisteban, R. & Gil, A. (2006). Nitrogenous compounds of interest in clinical Nutrition [Abstract]. *Nutrición Hospitalaria v.21 supl.2*. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112006000500003&script=sci_arttext.

Garrido, A. & Tejjón, J. (2006). *Excreción del nitrógeno proteico*. Fundamentos de Bioquímica Metabólica (2ª edición, pp 200-202). Tébar: Madrid.

Gil A. (2010). *Tratado de Nutrición Tomo I Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. (2da ed). España: Editorial Médica Panamericana.

Gil, A. & Sánchez, F. (2005). *Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición T.I*. España: Acción Medica.

Herrera, E. (1988). *Bioquímica perinatal*. Aspectos básicos y patológicos. Madrid: Ceura.

Korman, S., Kanazawa, N., Abu-Libdeh, B., Gutman, A., Tsujino S (2004). Hyperornithinemia, hyperammonemia, and homocitrullinuria syndrome with

evidence of mitochondrial dysfunction due to a novel SLC25A15 (ORNT1) gene mutation in a Palestinian family[Abstract].*J Neurol Sci*, 218(1-2):53-8

Malaver, L., Alméciga, C., Morales, I., Echeverri, O., Guevara, J., Zuluaga, E. et al.

(2009). Cuantificación de aminoácidos en plasma empleando cromatografía líquida de alta eficiencia. *Acta bioquím. clín. Latinoam*, (4): 43. Extraído el 17 de octubre del 2014, En:

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032529572009000400011&lng=pt&nrm=iso&tlng=es.

Mataix, J. (2009). *Proteínas y aminoácidos*. En J Mataix & F Sánchez. (eds.), *Nutrición y Alimentación Humana: tomo I Nutrientes y alimentos* (2ª ed). Ergon: Madrid.

Moonen, R., Huizing, M., Cavallero, G., González, L., Suárez, P., Bakker J. et al

(2014). Plasma levels of dimethylarginines in preterm very low birth weight neonates: its relation with perinatal factors and short-term outcome. *Int J Mol Sci*, 16:(1). Extraído el 05 enero 2015:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25546385>.

Richir, M., Siroen, M., Elburg, R., Fetter, W., Quik, F., Nijveldt R. et al. (2007). Low

Plasma Concentrations of Arginine and Asymmetric Dimethylarginine in Premature Infants with Necrotizing Enterocolitis. *Br J Nutr*. Extraído el 25

octubre 2014 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17381965>.

Richir, M., Van Leeuwen, P., Van den Berg, A., Wessels, R., Twisk, J., Rauwerda, J. et al. (2008). Plasma ADMA Concentrations at Birth and Mechanical Ventilation in Preterm Infants: A Prospective Pilot Study. *Pediatr Pulmonol*.
Extraído el 25 octubre 2014 en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991340>.

Rigo, J. & Senterre, J (1987). Significance of Plasma Amino Acid Pattern in Preterm Infants. *Biol Neonate*. 1:(41) .Extraído el 25 octubre 2014 en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3327533>.

Román, L., Fuente, A. & Jáuregui, I. (2009). Arginina, indicaciones y aplicaciones clínicas [versión electrónica]. *Nutrición Clínica en Medicina* Vol. III - Número 2 pp. 82-93. Disponible en:
http://www.ulceras.net/publicaciones/037_03_02_09.pdf.

Serrano, M (2009). *Papel de la placenta en el desarrollo fetal y en la salud del adulto*. Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular .Disponible en:
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/612/629>.

Setton & Fernández. (2014). *Nutrición en Pediatría Bases para la práctica clínica en niños sanos y enfermos*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría (2009). *Nutrición Pediátrica*.
Caracas: Editorial Médica Panamericana.

Teixeira, L., Bandeira, A., Campos, J., Machado, E., Neto, M. & Zundel, N. (2009).
Utilización de la citrulina plasmática como marcador de la función intestinal:
aplicaciones en trasplante de intestino y otras enfermedades digestivas [versión
electrónica]. *Rev Colomb Cir.* 2009;24:258-68.

Van Waardenburg, D., Betue, C., Luiking, Y., Engel, M. & Deutz, N. (2007). Plasma
Arginine and Citrulline Concentrations in Critically ill Children: Strong
Relation with Inflammation. *Am J Clin Nutr* Extraído el 25 octubre 2014 en:
<http://ajcn.nutrition.org/content/86/5/1438.full>.

Verdú, J. (2009). *Nutrición y Alimentación Humana Vol II*. (2da ed). Madrid: Ergon.

Wu, G., Jaeger, L., Bazer, F. & Rhoads, J. (2004). Arginine Deficiency in Preterm
Infants: Biochemical Mechanisms and Nutritional Implications. *J Nutr
Biochem.* 8:(15) Extraído el 25 octubre 2014, En:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15302078>.