Aminoácidos libres en líquido cefalorraquídeo de recién nacidos con encefalopatía hipóxico isquémica

Jorge Rodríguez O.¹; Ximena Lecaros G.²; Magdalena Cortés S.²

Free aminoacids in the cerebrospinal fluid of newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy

Cerebrospinal fluid free aminoacid (AA) composition depends on blood - CSF barrier, nervous tissue and ependima capitation. It has been previously reported that in mammalian cerebral cortex a decrease of adenosinetriphosphate (ATP) is associated with an increase in aspartic acid, a decrease in glutamic acid, aminobutyric acid and glutamine contents and that fuel deprivation causes changes in brain levels of ATP and those mentioned aminoacids. Using gas chromatography, after isobutanol esterification of the carboxylic group and heptafluorobutyrate acylation of the amino group, free aminoacid content of cerebrospinal fluid and plasma were studied in eight normal control newborn infants and eight patients with neonatal hypoxic ischemic encephalopathy in order to detect changes in these late, but no differences of aminoacid concentration in cerebrospinal fluid were recorded among both groups. This result is in contradiction with recent reports of increased excitatory aminoacid (glutamic and aspartic acid) concentration in the cerebrospinal fluid of six asphyxiated newborn infants, and of a good correlation of these changes and neurologic prognosis of patients. More experience is needed in these respect.

(Key words: amino acids, cerebrospinal fluid cerebral ischemia, newborn.)

Durante los primeros días del período neonatal, los aminoácidos libres (AA) del plasma experimentan cambios significativos, disminuyendo en general sus concentraciones¹. La relación entre las concentraciones de los aminoácidos en el plasma y el líquido cefalorraquídeo (LCR) ha sido estudiada principalmente en edades más tardías²⁻⁴ y para la mayoría de ellos es menor en el segundo caso, con coeficientes individuales de relación que sugieren que la composición aminoacídica de este último dependería fundamentalmente del paso a través de la barrera hematoencefálica, pero también de la captación por el tejido cerebral y ependimario de cada compuesto⁵. Por otra parte, el glutamato y los aminoácidos relacionados, incluyendo glutamina, aspartato y gama-aminobutirato, se encuentran

en concentraciones elevadas en el parénquima cerebral, con respecto a otros tejidos⁶ y se ha sugerido que ellos juegan un importante rol como neurotransmisores⁷. Recientemente se ha señalado también que, en la corteza cerebral de mamíferos, la disminución de adenosina trifosfato (ATP) se asocia con aumento del aspartato y disminución del glutamato, aminobutirato y glutamina y que la privación energética causa caídas significativas en los niveles de ATP de estos aminoácidos en el cerebro⁸.

La asfixia es una condición clínica en que la privación energética aguda está bien representada. Nuestra hipótesis de trabajo ha sido que pudiese existir un efecto directo de la asfixia sobre la difusión de aminoácidos libres a través de la barrera hematoencefálica. El propósito de esta investigación fue medir el contenido de aminoácidos en el plasma y el líquido cefalorraquídeo en recién nacidos con encefalopatía hipóxico isquémica y sin ella, con el objeto de comprobar si existen variaciones en esta situación con respecto a recién nacidos sanos.

1. Universidad de Valparaíso, Hospital Dr. Gustavo Fricke, Viña del Mar.

2. Bioquímico. Laboratorio Cromatografía Gaseosa, Hospital Dr. Gustavo Fricke, Viña del Mar.

Trabajo favorecido con aportes del Proyecto 15/90, de la Dirección de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Valparaíso.

Tabla

Concentración de aminoácidos libres
en líquido cefalorraquídeo de recién nacidos
con y sin isquemia cerebral

Aminoácidos μmol/l	Controles (n: 8)	Encefalopatía hipó- xico-isquémica (n: 8)
Histidina	26 (0 - 190)	29 (0 - 139)
Alanina	302 (12 - 1400)	352 (0 - 1399)
Glicina	108 (19 - 306)	152 (0 - 559)
Valina	206 (26 - 248)	210 (18 - 270)
Treonina	187 (90 - 1200)	219 (104 - 1314)
Leucina	14 (12 - 16)	9 (2 - 14)
Isoleucina	58 (45 - 75)	62 (9 - 356)
Prolina	299 (93 - 390)	613 (18 - 720)
Serina	123 (80 - 148)	79 (20 - 139)
Asparagina	70 (35 - 97)	72 (40 - 92)
Metionina	27 (0 - 42)	147 (18 - 216)
Fenilalanina	60 (52 - 69)	43 (0 - 184)
Omitina	6 (2 - 12)	5 (0 - 9)
Acido glutámico	0,6 (0,2 - 1,8)	1,3 (0,3 - 1,7)
Lisina	37 (20 - 49)	30 (2 - 38)
Acido aspártico	6 (0 - 8)	9 (0 - 25)
Tirosina	10 (8 - 18)	8 (0 - 16)
Triptofano	1,3 (0 - 1,7)	2,3 (0 - 2,7)

Márgenes entre paréntesis.

Pacientes y Métodos

Se estudiaron ocho recién nacidos de término, cinco de sexo femenino, cuyo peso de nacimiento varió entre 2 900 g y 3 600 g. En todos los pacientes la gestación había sido normal, el nacimiento por vía vaginal, la calificación de Apgar menor de 5 a los 5 min. sufrieron depresión respiratoria atribuible a una situación aguda durante el parto, mostraban síntomas clínicos clásicos de asfixia severa (coma, hipotonía y, en seis casos, convulsiones), hipoxemia y acidosis y el diagnóstico de encefalopatía hipóxico-isquémica en sus grados II o III fue hecho de acuerdo a los criterios de SARNAT. Ninguno tenía signos de infección, trastornos electrolíticos. En sólo dos se registró moderada hipoglicemia durante el período del estudio. En todos se registró, mediante ultrasonografía en tiempo real durante el período agudo de la encefalopatía hipóxico-isquémica, disminución variable pero significativa de la pulsatilidad de arterias pericallosas y epicorticales, asociada o no a hiperlucidez de la sustancia blanca, lo que fue interpretado como consecuencia de hipoperfusión y edema cerebral. En ningún paciente se demostraron infartos isquémicos cerebrales o leucomalacia. No fueron incluidos recién nacidos con malnutrición intrauterina o sospecha de infección congénita, encefalopatía hipóxico-isquémica con signos de hemorragias cerebrales periventriculares o parenquimatosas identificados mediante ultrasonido o en cuyos líquidos cerebrospinales se contaron más de cincuenta hemátides por mm cúbico. Cinco de los recién nacidos seleccionados como casos requirieron ventilación mecánica durante el estudio.

En el electroencefalograma de tres casos se registró un patrón de ondas lentas de supresión y en cinco la actividad eléctrica cerebral mostraba un patrón discontinuo de menos de tres ondas por segundo o actividad espicular. La actividad en el suero de creatinafosfoquinasa (CPK) total estaba moderadamente aumentada en tres pacientes en los cuales se determinó. Con una sola excepción los pacientes requirieron tratamiento con fenobarbital en dosis usuales. Las punciones lumbares fueron realizadas entre las 48 y 72 horas de vida en los pacientes, en ausencia de nutrición parenteral con aminoácidos en el momento de obtener las muestras, las que fueron recogidas en un tubo de vidrio, después de haber dejado que 0,5 ml del líquido hubiesen drenado a través de la aguja, enfriadas en hielo seco por un minuto y luego guardadas a -20° C hasta su análisis.

Los aminoácidos fueron determinados de acuerdo a un método previamente descrito⁹. En síntesis, el líquido cefalorraquídeo de los pacientes fue centrifugado para remover restos celulares a 3 000 rpm durante 10 min. Las muestras fueron deproteinizadas con ácido sulfosalicílico y se obtuvieron efluentes de los aminoácidos mediante columna con resina de intercambio iónico Dowex. Estos fueron sometidos a esterificación de su grupo carboxílico con isobutanol y ácido clorhídrico y acilación del grupo amino con anhídrido heptafluorbutílico y analizados mediante cromatografía gaseosa en un equipo "Shimadzu" (R) equipado con doble llama de hidrógeno en un programa lineal de temperatura, empleando nitrógeno como gas transportador. Las columnas de vidrio fueron rellenas con fase SUPELCO SE-30 al 3% y condicionadas a 270° C durante 24 horas. La temperatura inicial de la columna durante la cromatografía fue de 100° C y la final 240° C. La presión de salida del instrumento fue de 1,25 kg/cm².

La cantidad de aminoácidos eluidos de la columna de cromatografía gaseosa se determinó calculando la respuesta molar relativa a un estándar interno de norleucina. La identificación de los picos se obtuvo mediante la derivatización individual de cada aminoácido y comparación posterior de los respectivos tiempos de retención. Una segunda identificación de los picos fue realizada mediante coinyección. El área de los picos de aminoácidos fue calculada mediante integración computacional realizada con un instrumento Cromatopac adosado al cromatógrafo⁹. Los valores obtenidos fueron comparados con los registrados de ocho recién nacidos sanos de término y se expresaron como la media de los experimentos y sus desviaciones estándar. El significado fue calculado mediante el sistema STATPACK.

Resultados

La aminoaciduria fue normal en todos los pacientes y en dos casos las concentraciones plasmáticas de glicina presentó valores en los rangos límites altos considerando la edad⁹.

Los tiempos de retención de los aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo variaron entre 6,38 y 21,03 minutos. La respuesta molar relativa a norleucina varió entre 0,6 y 1,99. En la figura se

correlacionado con el pronóstico neurológico, lo que no se cumplió. En nuestra opinión los aminoácidos libres en líquido cefalorraquídeo no representan un indicador seguro de compromiso neuronal en la asfixia, pero se requiere más experiencias antes de pronunciarse definitivamente sobre esta materia, en consideración al tamaño limitado de los grupos estudiados y lo contradictorio de los resultados.

Resumen

La composición de aminoácidos libres del líquido cefalorraquídeo depende del paso de éstos a través de la barrera hematoencefálica, de la síntesis en el tejido nervioso y de la captación endocitótica de aminoácidos. En la corteza cerebral de mamíferos, la disminución de la adenosina trifosfato (ATP) se encuentra asociada con aumento del aspartato y disminución de glutamato, aminobutirato y glutamina. Además, la privación energética modifica las concentraciones de ATP y de estos aminoácidos en el cerebro. Utilizando la técnica de cromatografía gaseosa asociada a derivatización, se estudió el contenido de aminoácidos libres en el líquido cefalorraquídeo y plasma de ocho pacientes con encefalopatía hipóxico isquémica, con el objeto de definir si existen variaciones con respecto al observado en recién nacidos no asfixiados. Las concentraciones medidas fueron similares en ambos grupos. Estos resultados son contradictorios con publicaciones recientes de autores finlandeses, que registraron aumento de las concentraciones de los aminoácidos excitatorios (glutamato y ácido aspártico) en el líquido cefalorraquídeo de seis recién nacidos asfixiados, el que guardaría relación con un mal pronóstico neurológico. En nuestra opinión se necesita mayor experiencia respecto a este problema.

(Palabras clave: isquemia cerebral, recién nacidos, aminoácidos, líquido cefalorraquídeo.)

Agradecimientos

Al Dr. Raúl González A., la revisión crítica del manuscrito.

Referencias

1. Dickinson JC, Rosenblum H, and Hamilton PB: Ion exchange chromatography of the free amino acids in the plasma of infants under 2 500 grams at birth. *Pediatrics* 1970; 45: 606-613.
2. Perry TL, and Jones RT: The amino acid content of human cerebrospinal fluid in normal individuals and in mental defectives. *J Clin Invest* 1961; 40: 1363-1372.
3. Fisher RG, Pomeroy J, and Henry JP: The free amino acids in adult human cerebrospinal fluid. *Acta Neurol Scand* 1968; 44: 619-630.
4. Dickinson JC, and Hamilton PB: The free amino acids of human spinal fluid determined by ion exchange chromatography. *J Neurochem* 1966; 3: 1179-1187.
5. Scriver CH R, and Rosenberg L: Metabolismo de los aminoácidos y sus trastornos. In Vol IX Problemas actuales de la Pediatría Barcelona, 1979.
6. Lajtha AL, Maker HS, Clarke DD: Metabolism and transport of carbohydrates and amino acids. In: Siegel GJ, Albers RW, Agranoff BW, Katzman RK, eds. *Basic neurochemistry*. 3rd ed. Boston: Little & Brown, 1981: 329-353.
7. Fonnum F: Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 1984; 42: 1-11.
8. Ando M, Itoh T: Changes of Amino Acid by the Deprivation of Energy Sources in the Cerebral Cortex. *Brain Dev* 1989; 11: 169-174.
9. Rodríguez J, Pino R, Costa E: Concentraciones de aminoácidos en suero y orina en niños chilenos de 0-6 años de edad. *Rev Chil Pediatr* 1987; 58: 436-441.
10. Cremades A, Peñañiel R, Monserrat F, Cerón I, and Pérez-Flores D: Free amino acids in the cerebrospinal fluid of children with febrile seizures. *Neuropediatrics* 1989; 20: 129-131.
11. Perry T, Krieger Ch, Hansen Sh, Elisen A: Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 1990; 28: 12-17.
12. Martinak J, Saganaová K, and Chavko M: Free and Peptide-Bound amino acids as indicators of ischemic damage of the Rabbit Spinal Cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50: 73-81.
13. Rikonen R, Kero P, Simell O: Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid in neonatal asphyxia. *Pediatr Neurol* 1992; 8: 37-40.