

Aminoácidos en líquido cefalorraquídeo y plasma: utilidad en el estudio de las enfermedades neuropediátricas

Erika Jiménez, Aida Ormazábal, Mercedes Serrano, Carlos I. Ortez-González, Rafael Artuch, Àngels García-Cazorla, Jaume Campistol

Servicio de Neurología Pediátrica (E. Jiménez, C.I. Ortez-González, A. García-Cazorla, J. Campistol); Servicio de Bioquímica (A. Ormazábal, M. Serrano, R. Artuch). Hospital Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat, Barcelona, España.

Correspondencia:

Dra. Erika Jiménez González. Servicio de Neurología Pediátrica. Hospital Sant Joan de Déu. Pg. Sant Joan de Déu, 2. E-08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona).

E-mail:

erika.jimenezgonzalez@gmail.com

Trabajo presentado como comunicación oral en la XXXV Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología Pediátrica (Granada, 16-18 de junio de 2011).

Aceptado tras revisión externa: 29.11.11.

Cómo citar este artículo:

Jiménez E, Ormazábal A, Serrano M, Ortez-González CI, Artuch R, García-Cazorla A, et al. Aminoácidos en líquido cefalorraquídeo y plasma: utilidad en el estudio de las enfermedades neuropediátricas. Rev Neurol 2012; 54: 394-8.

© 2012 Revista de Neurología

Introducción. El estudio de aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es imprescindible en el diagnóstico de algunas enfermedades neurológicas y apoya el diagnóstico en otras. No existen trabajos en la bibliografía que muestren la relación fisiológica entre los valores de aminoácidos en LCR y plasma en población pediátrica.

Objetivo. Definir unas ratios de aminoácidos en plasma y LCR en población pediátrica que permitan su uso en la práctica clínica diaria.

Pacientes y métodos. Se han recogido y analizado de forma retrospectiva los aminogramas en plasma y LCR de 105 pacientes de edades comprendidas entre 0 y 12 meses. Se han incluido aminogramas cuyos valores de aminoácidos son normales según los valores de referencia de nuestro laboratorio. El análisis cuantitativo de aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución, y el análisis estadístico, con el programa SPSS v. 19.0.

Resultados. Se muestran los valores medios, rango y desviación estándar de las concentraciones de aminoácidos en plasma y LCR, así como de las ratios LCR/plasma. Se han encontrado correlaciones significativas a partir de 0,6 entre diferentes aminoácidos neutros, sobre todo los de peso molecular más pequeño (Thr, Ser, Gly y Ala).

Conclusiones. La existencia de correlaciones significativas entre diferentes aminoácidos neutros apoya el hecho de que éstos compartan los mismos transportadores en la barrera hematoencefálica. La estandarización de ratios de aminoácidos permitirá aumentar la sensibilidad en la detección de valores patológicos en plasma y LCR, profundizar en la fisiopatología de enfermedades neurológicas y quizá describir nuevas aminoacidopatías.

Palabras clave. Aminoacidopatías. Aminoácidos neutros. Barrera hematoencefálica. Líquido cefalorraquídeo. Ratio de aminoácidos LCR/plasma. Transporte de aminoácidos.

Introducción y objetivos

El estudio de aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es de gran utilidad en el diagnóstico de diferentes enfermedades neuropediátricas. De hecho, aunque pocas, existen enfermedades en las que el estudio de aminoácidos en LCR es imprescindible para poder hacer un diagnóstico (déficit de serina, hiperglucemia no cetósica, etc.), mientras que en otras puede servirnos de apoyo (déficit de piridoxal fosfato, enfermedad de sustancia blanca evanescente, etc. [1]).

No existen trabajos en la bibliografía que muestren la relación fisiológica entre los valores de aminoácidos en plasma y LCR en población pediátrica. Los datos existentes son escasos y antiguos. Únicamente se encuentra un estudio del año 1985 [2] con valores que se obtienen a partir de población no pediátrica y tamaños de muestra pequeños.

Estandarizar las ratios de aminoácidos en plasma y LCR podría ayudar a profundizar en la fisiopatología

de enfermedades neurológicas que requieran en algún momento la realización de una punción lumbar (ya sea para el diagnóstico, en descompensaciones o en su evolución), identificar aminoácidos que comparten el mismo transportador a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y quizá detectar nuevas aminoacidopatías de transporte o síntesis.

La idea de definir unas ratios de normalidad surgió a propósito de la descompensación metabólica que presentó un lactante de 17 meses con enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, en el que los valores de leucina en plasma no justificaban la sintomatología clínica y los hallazgos radiológicos, al encontrarse por debajo de la concentración que normalmente hallaríamos en descompensaciones [3].

El objetivo de este trabajo es definir unas ratios fiables de aminoácidos en plasma y LCR en población pediátrica que nos permitan su uso en la práctica clínica diaria, ya sea en el diagnóstico de enfermedades, en el conocimiento de la fisiopatología o en un mejor manejo terapéutico.

Figura 1. Recta de regresión de aminoácidos con correlaciones significativas: Ser/Thr ($r = 0,8$).

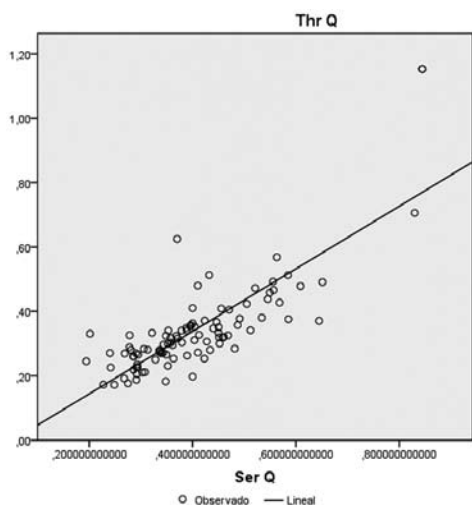


Tabla I. Valores normales de las concentraciones de aminoácidos en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) y correlación de las concentraciones (r).

| | Concentración en el plasma | | | Concentración en el LCR | | | r | p |
|-----|----------------------------|---------|--------|-------------------------|---------|--------|------|----------------|
| | Media | Rango | DE | Media | Rango | DE | | |
| Thr | 122,19 | 52-283 | 45,42 | 39,85 | 10-113 | 18,94 | 0,52 | 0,01 |
| Ser | 125,12 | 70-233 | 29,98 | 49,07 | 25-87 | 12,99 | 0,23 | 0,05 |
| Gln | 547,63 | 276-769 | 105,70 | 541,89 | 195-941 | 146,62 | 0,22 | 0,05 |
| Gly | 212,88 | 112-506 | 57,66 | 6,95 | 1-19 | 3,20 | 0,06 | — ^a |
| Ala | 294,15 | 135-579 | 92,91 | 33,06 | 8-92 | 14,66 | 0,28 | 0,01 |
| Val | 182,17 | 103-383 | 48,82 | 20,73 | 7-96 | 11,12 | 0,32 | 0,01 |
| Met | 22,75 | 10-39 | 6,48 | 3,71 | 1-18 | 2,25 | 0,34 | 0,01 |
| Ile | 52,34 | 34-88 | 11,55 | 6,39 | 2-15 | 2,67 | 0,22 | 0,05 |
| Leu | 95,75 | 40-170 | 25,53 | 15,68 | 4-64 | 8,09 | 0,37 | 0,01 |
| Tyr | 63,43 | 29-99 | 16,66 | 16,48 | 3-40 | 6,24 | 0,59 | 0,01 |
| Phe | 46,02 | 23-87 | 10,69 | 11,19 | 3-41 | 5,83 | 0,27 | 0,01 |
| Orn | 64,09 | 30-150 | 22,95 | 5,96 | 0-16 | 2,67 | 0,58 | 0,01 |
| Lys | 144,43 | 79-263 | 35,93 | 22,05 | 10-38 | 6,28 | 0,44 | 0,01 |
| Arg | 68,47 | 40-112 | 17,75 | 19,47 | 4-34 | 6,46 | 0,35 | 0,01 |

^a Ausencia de significación. DE: desviación estándar.

Pacientes y métodos

Se han recogido y analizado de forma retrospectiva los valores de aminoácidos en plasma y LCR de 105 pacientes de edades comprendidas entre 0-12 meses. En 11 de los 105 pacientes los diagnósticos de sospecha por los que se realizó la punción lumbar no se confirmaron (enfermedades metabólicas), en 61 pacientes la patología que se diagnosticó no afectaba al metabolismo y transporte de aminoácidos –sospecha de procesos infecciosos del sistema nervioso central (SNC), retrasos del desarrollo sin etiología demostrada o procesos malformativos del SNC– y en los 33 restantes (convulsiones neonatales aisladas y leucoencefalopatías) los aminogramas en plasma y LCR se encontraban dentro de límites normales según los valores de referencia de nuestro laboratorio. En todos los casos se excluyeron LCR hemáticos, con pleocitosis o hiperproteíorraquia.

La recogida de muestras se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo en todos los pacientes, según ha sido previamente descrito por nuestro grupo [4]. Brevemente, las primeras cinco gotas se destinan al estudio de la citocímica; el segundo, tercer y cuarto tubos contienen diez gotas cada uno, que se destinan al estudio de neurotransmisores (el segundo), pterinas y folatos (el tercero) y aminoácidos (el cuarto). El tubo destinado al estudio de pterinas

y folatos se debe aislar de la luz para evitar la degradación de éstos.

El análisis de aminoácidos en plasma y LCR se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución –*high performance liquid chromatography* (HPLC)–. Asimismo, se analizaron aquellos valores de aminoácidos cuya concentración en ambos fluidos era fiable de acuerdo con la sensibilidad de la técnica: Thr, Ser, Gln, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Orn, Lys, Arg.

El análisis estadístico se efectuó con el programa SPSS v. 19.0.

Resultados

Valores medios, rango y desviación estándar de aminoácidos en plasma y LCR se recogen en la tabla I.

Tabla II. Ratios de aminoácidos en líquido cefalorraquídeo y plasma.

| | Ratio LCR/plasma | IC 95% | CV | DE |
|-----|------------------|-------------|-------|-------|
| Thr | 0,344 | 0,313-0,374 | 44,8% | 0,154 |
| Ser | 0,407 | 0,382-0,432 | 31,4% | 0,128 |
| Gln | 1,005 | 0,946-1,064 | 29,5% | 0,296 |
| Gly | 0,034 | 0,030-0,037 | 56,5% | 0,019 |
| Ala | 0,119 | 0,105-0,132 | 57,7% | 0,068 |
| Val | 0,115 | 0,105-0,126 | 46% | 0,053 |
| Met | 0,167 | 0,150-0,184 | 50% | 0,084 |
| Ile | 0,123 | 0,112-0,133 | 42% | 0,052 |
| Leu | 0,167 | 0,152-0,182 | 44,7% | 0,075 |
| Tyr | 0,264 | 0,247-0,280 | 31,6% | 0,083 |
| Phe | 0,249 | 0,227-0,271 | 44,8% | 0,112 |
| Orn | 0,098 | 0,090-0,105 | 38,8% | 0,038 |
| Lys | 0,157 | 0,148-0,165 | 28% | 0,440 |
| Arg | 0,298 | 0,278-0,317 | 32,9% | 0,098 |

CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; LCR: líquido cefalorraquídeo.

Las ratios o cocientes de aminoácidos en plasma y LCR (ratio LCR/plasma) se calcularon a partir de las parejas de aminoácidos en LCR y plasma de cada uno de los 105 pacientes. Las ratios medias, el rango, la desviación estándar y el coeficiente de variación se recogen en la tabla II.

Se han calculado los coeficientes de correlación (r) de las concentraciones de aminoácidos en plasma y en LCR, así como de los cocientes o ratios (Tablas I y II, respectivamente). Se han considerado significativas las correlaciones a partir de 0,6. La mejor correlación se ha encontrado entre los diferentes aminoácidos neutros (Thr, Ser, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr y Phe), sobre todo en los de peso molecular más pequeño (Thr, Ser, Gly y Ala). También se han obtenido correlaciones de 0,6 entre la valina (aminoácido neutro grande) y el resto de aminoácidos neutros pequeños, así como otros de peso molecular mayor (Tabla III). El cálculo de la recta de regresión permite observar gráficamente la relación que comparten los aminoácidos con correlaciones

significativas (Figs. 1 y 2). Los coeficientes de correlación del resto de aminoácidos ($r = 0,0-0,5$) no se han considerado estadísticamente significativos.

Discusión

Los valores medios y rangos de la concentración de aminoácidos obtenidos se ajustan con pequeñas variaciones a los valores de referencia de nuestro laboratorio [4], lo que puede deberse a un tamaño de la muestra pequeño. No obstante, las diferencias son mínimas y no invalidan su aplicación en la práctica clínica.

Las diferencias de concentración observadas entre los valores de aminoácidos en LCR y plasma hacen suponer que existen otros factores diferentes de la concentración en plasma que determinan la concentración en LCR y que influyen en el transporte de aminoácidos a través de la BHE. Esas diferencias se ponen de manifiesto a través de los coeficientes de correlación (Tabla I), que muestran que la influencia de la BHE no es uniforme para los diferentes aminoácidos estudiados. Valores pequeños de r significan que existe una correlación pobre entre las concentraciones de aminoácidos en plasma y LCR.

Las correlaciones entre las ratios de aminoácidos en LCR y plasma se han usado en trabajos anteriores para identificar aminoácidos que podrían compartir un transportador común, incluso antes de que se identificaran las moléculas concretas, de forma que correlaciones a partir de 0,6 se interpretaban como significativas, y los aminoácidos que las compartían eran sospechosos de presentar mecanismos de transporte común [2]. En nuestro trabajo, las mejores correlaciones (0,6 o mayores) (Tabla II) se obtienen entre los aminoácidos neutros, y en concreto entre los neutros pequeños (Thr, Ser, Gly y Ala), que hoy sabemos que comparten los mismos transportadores en el cerebro [5-7]. Específicamente, uno de los transportadores implicados es el LAT2, que pertenece a la familia de transportadores LAT (sistema L de transportadores de aminoácidos), inicialmente descrito por Ehrlich, que intercambia aminoácidos neutros pequeños y grandes mediante un transporte independiente del sodio [8-10]. Otro transportador también implicado es el Asc-1, parecido al anterior, pero sólo intercambia aminoácidos neutros de peso molecular pequeño. Este último no pertenece a la familia LAT, pues aunque el transporte es también independiente del sodio, no cumple todas las características que deben cumplir estos transportadores [7-9].

Figura 2. Recta de regresión de aminoácidos con correlaciones significativas: Leu/Tyr ($r = 0,6$).

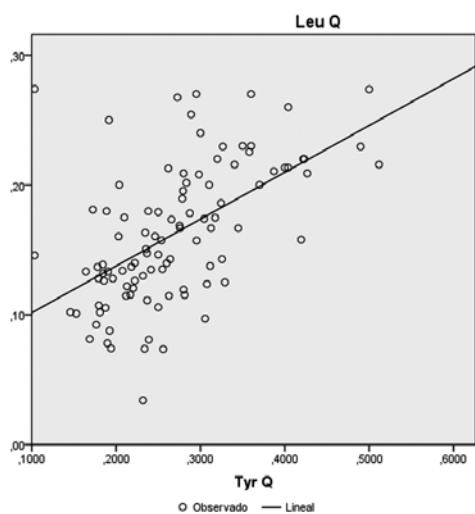


Tabla III. Correlación de los ratios líquido cefalorraquídeo/plasma.

| | Thr | Ser | Gly | Ala | Val | Ile | Leu | Tyr | Phe |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | 1 | | | | | | | | |
| Ser | 0,8 | 1 | | | | | | | |
| Gly | 0,6 | 0,5 | 1 | | | | | | |
| Ala | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 1 | | | | | |
| Val | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 1 | | | | |
| Ile | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 1 | | | |
| Leu | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 1 | | |
| Tyr | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 1 | |
| Phe | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 1 |

En todos los casos, $p < 0,01$. Se señalan en cursiva las correlaciones significativas ($r \geq 0,6$).

Muchas correlaciones entre los ratios de aminoácidos se han quedado a las puertas de la significación estadística ($r = 0,5$) (Tabla II). Además, estos coeficientes de correlación se observan entre diferentes aminoácidos neutros, que hoy sabemos que comparten los mismos transportadores. Posiblemente el hecho de no obtener una r mayor se deba tanto a rangos de normalidad de concentración de aminoácidos amplios como a un tamaño de la muestra pequeño. El aumento del tamaño de la muestra probablemente conseguiría la significación estadística en estos aminoácidos con $r = 0,5$.

Una de las mayores limitaciones de este trabajo es la selección de la muestra, dado que se trata de pacientes con diferentes enfermedades neurológicas, y estamos tratando de establecer unas ratios de normalidad en pacientes que a priori no son sanos. Sin embargo, hay que aclarar que en muchas ocasiones los diagnósticos de sospecha por los que se realizó la punción lumbar no se confirmaron (11 pacientes), en otros la patología que se diagnosticó no afectaba al metabolismo y transporte de aminoácidos (61 pacientes), se excluyeron LCR cuya citoquímica estaba alterada y pudiera hacer pensar en procesos inflamatorios del SNC y, finalmente, sólo se recogieron aquellos aminogramas con valores dentro de límites normales según los valores de referencia de nuestro laboratorio (33 pacientes restantes). Hay que señalar la dificultad para obtener una muestra de pacientes sanos en edad pediátrica

debido a limitaciones éticas, sobre todo a la hora de realizar una punción lumbar.

En conclusión, la estandarización de unas ratios fiables de las concentraciones de aminoácidos en plasma y LCR en población pediátrica ayudaría a la comprensión de la fisiopatología de enfermedades que en algún momento precisaran la realización de una punción lumbar. También sería útil en la prevención de descompensaciones, puesto que los intervalos de confianza de los ratios son más estrechos y se podrían detectar valores patológicos con más certeza que con la comparación de los valores absolutos en plasma y LCR. Además, permitiría identificar aminoácidos que compartieran el mismo transportador en la BHE, como previamente demostró Kruse en 1985 en población adulta [2]. Y aún más, probablemente conocer unas ratios fiables y aminoácidos que comparten el mismo transportador y características de transporte podría ayudar en el diagnóstico de nuevas aminoacidopatías.

Bibliografía

1. Van der Knaap MS, Wevers RA, Kure S, Gabreëls FJ, Verhoeven NM, Van Raaij-Selten B, et al. Increased cerebrospinal fluid glycine: a biochemical marker for a leucoencephalopathy with vanishing white matter. *J Child Neurol* 1999; 14: 728-31.
2. Kruse T, Reiber H, Neuhoff V. Amino acid transport across the human blood-CSF barrier. An evaluation graph for amino acid concentrations in cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* 1985; 70: 129-38.

3. Jiménez E, Ormazábal A, Serrano M, Ortez C, Artuch R, García-Cazorla A. Aminoácidos en LCR y plasma: utilidad en el estudio de las enfermedades neuropediátricas. XXXV Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología Pediátrica. Granada, España, 16-18 de junio de 2011.
4. Ormazábal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández-Álvarez E, Campistol J, Artuch R. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterines. *J Neurosci Methods* 2005; 142: 153-8.
5. Palacín M, Bertrán J, Zorzano A. Heteromeric amino acid transporters explain inherited aminoacidurias. *Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9: 547-53.
6. Palacín M. The family of heteromultimeric amino acid transporters reveals aminoaciduria genes. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 5-8.
7. Palacín M, Estévez R, Bertrán J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 1998; 78: 969-1054.
8. Verrey F, Closs E, Wagner C, Palacín M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch* 2004; 447: 532-42.
9. Boday S, Matín L, Zorzano A, Palacín M, Estévez R, Bertrán J. Identification of LAT 4, a novel amino acid transporter with system L activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 12002-11.
10. Pineda M, Fernández E, Torrents D, Estévez R, López C, Camps M, et al. Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1999; 274: 19738-44.

Amino acids in cerebrospinal fluid and plasma: its usefulness in the study of neuropaediatric diseases

Introduction. Studying the amino acids in cerebrospinal fluid (CSF) is essential in the diagnosis of some neurological diseases and is an important aid in the diagnosis of others. No research has been published in the literature to prove the physiological relationship between the values of amino acids in CSF and plasma in the paediatric population.

Aim. To define a set of ratios for amino acids in plasma and CSF in the paediatric population that can be used in daily clinical practice.

Patients and methods. The aminograms in plasma and CSF of 105 patients with ages between 0 and 12 months were collected and analysed retrospectively. Aminograms with amino acid values that are considered to be normal according to the reference values of our laboratory were included in the sample. The quantitative analysis of amino acids was performed using high-resolution liquid chromatography and statistical analysis with the software application SPSS 19.0.

Results. The mean values, range and standard deviation of the amino acid concentrations in plasma and CSF, together with the CSF/plasma ratios, are reported. Significant correlations were found from 0.6 onwards between different neutral amino acids, above all in those with smaller molecular weights (Thr, Ser, Gly and Ala).

Conclusions. The existence of significant correlations between the different neutral amino acids supports the idea that they share the same transporters in the blood-brain barrier. Standardising the amino acid ratios will make it possible to increase sensitivity in the detection of pathological values in plasma and CSF, to further knowledge of the pathophysiology of neurological diseases and perhaps to describe new aminoacidopathies.

Key words. Aminoacidopathies. Blood-brain barrier. Cerebrospinal fluid. CSF/plasma amino acid ratios. Neutral amino acids. Transport of amino acids.