

EL TEST DE DENSIDAD Y LA CREATINA ERITROCITARIA: 2 POSIBLES TECNICAS PARA EVALUAR ASFIXIA PERINATAL

INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS Y PRECLINICAS (ICBP)
"VICTORIA DE GIRON"

Dr. Pablo Cáprio, Dr. Raúl Fernández-Regalado**, Dra. María A. Presmanes**, Dr. Sergio Muñoz***,
Dr. Jurgen Gross**** y Téc. Clemente Rodríguez******

Se llevó a cabo este estudio con el propósito de evaluar, en forma preliminar en nuestro país, la posible utilidad del test de densidad eritrocitaria y la creatina eritrocitaria como indicadores de asfixia perinatal.

INTRODUCCION

La hipoxia intrauterina representa una de las causas mayores de mortalidad y morbilidad perinatales. El riesgo de los que sobreviven consiste en el daño cerebral y se considera a la hipoxia como la causa más frecuente de defectos neurológicos no progresivos que se diagnostican en la infancia.¹

La asfixia fetal puede ser reconocida al nacimiento por el conteo de Apgar menor de 7, el pH del cordón umbilical (arterial) menor de 7,20 y la concentración de ácido láctico elevada en sangre. Sin embargo, por estos métodos son detectados solamente eventos hipóxicos muy recientes y relativamente severos; por ello, los perinatólogos están aún tratando de hallar indicadores más sensitivos de la privación tisular de oxígeno ocurrida en la vida fetal o en las primeras horas de la vida posnatal.^{2, 3}

Recientemente han sido desarrolladas y evaluadas en la RDA 2 nuevas técnicas de laboratorio precisamente encaminadas a este fin: el test de densidad eritrocitaria (TDE)⁴ y la creatina eritrocitaria (CE).⁵ El fundamento de ambas consiste en que la hipoxia crónica da lugar a un aumento en la secreción de eritropoyetina, y se conoce que esta glicoproteína hormonal provoca, al estimular la eritropoyesis, un incremento en sangre periférica de las células jóvenes de la serie roja, las cuales son menos densas que las células maduras y tienen además un contenido de creatina en su interior que es aproximadamente 10 veces mayor.⁴⁻⁶

* Especialista de I Grado en Fisiología. Facultad de Medicina "Salvador Allende".

** Especialista de II Grado en Bioquímica. ICBP "Victoria de Girón".

*** Especialista de I Grado en Neonatología. Hospital Ginecoobstétrico General "Eusebio Hernández".

**** Doctor en Ciencias Médicas. Charité (Universidad Humboldt), RDA.

***** Auxiliar Técnico de Laboratorio. ICBP "Victoria de Girón".

Los resultados obtenidos hasta la fecha son prometedores, pues se han encontrado correlaciones significativas entre los valores de estos procedimientos y el nivel de asfixia, evaluado éste clínicamente.^{4,5} Los propósitos del presente trabajo han sido, fundamentalmente, introducir y evaluar el TDE y la CE en una muestra de nuestra población de recién nacidos.

MATERIAL Y METODO

En esta investigación fue estudiado un total de 72 recién nacidos, clasificados en 3 grupos de acuerdo con el peso al nacer y al conteo de Apgar al minuto del nacimiento.

Grupo I = peso $\geq$ 2 500 g ; Apgar $>$ 7

Grupo II = peso $<$ 2 500 g ; Apgar $>$ 7

Grupo III = peso $\geq$ 2 500 g y $<$ 2 500 g ; Apgar $\leq$ 7

Este último grupo, que en realidad fue mixto en cuanto al peso, estuvo formado por 10 recién nacidos con peso inferior a 2 500 g y 4 recién nacidos con peso superior o igual a esta cifra.

De todos los recién nacidos se obtuvo, por punción del talón, una muestra de sangre (aproximadamente 500-600 μ L), que fue depositada en viales heparinizados. Esta muestra de sangre se extrajo, en la mayoría de los casos, entre las 24 y 48 horas siguientes al nacimiento.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas durante 5 minutos a 3 000 *rev/min* y el plasma decantado.

La fracción celular fue incubada durante 30 minutos con 2,0 mL aproximadamente del amortiguador de incubación (6,75 g de NaCl; 4,85 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,824 g de $\text{K H}_2\text{PO}_4$; 2,0 g de glucosa y H_2O hasta 1 L); este amortiguador debe tener un pH 7,4 y osmolaridad de 300 miliosmoles aproximadamente. Después de la incubación se realizó una nueva centrifugación a 3 000 *rev/min* durante 5 minutos; entonces se decantó la mayor parte del sobrenadante por pipeteo, después del cual quedó un hematócrito de aproximadamente el 70 %.

Se realizó entonces un microhematócrito para conocer el valor exacto de la fracción celular. De esta muestra se tomaron alícuotas para el TDE y la CE (figura 1).

Para el TDE,⁴ la alícuota de sangre se introduce en un tubo capilar de microhematócrito, el cual ha sido sumergido previamente por uno de sus extremos en una mezcla de ftalatos de densidad 1,088 *kg/L*. Esta mezcla se prepara a partir de N — butilftalato (densidad = 1,0462 *kg/L*) y di-metilftalato (densidad = 1,1905 *kg/L*). Se efectuó entonces una centrifugación a 12 000 g durante 10 minutos y a una temperatura no muy superior a 22 °C. Las capas de células ligeras y pesadas quedan separadas entonces por la mezcla de ftalatos y son medidas con precisión con un pie de rey. Se obtiene entonces el porcentaje de células ligeras. Si la temperatura del ambiente se apartaba mucho de la temperatura del test (22 °C), se realizaba la corrección siguiente:

$$\text{TDE}_{22} = \text{TDE}_a + \text{TDE}_a (\text{temperatura real} - 22^\circ\text{C})$$

donde: TDE_a = valor del TDE a la temperatura real

$$\text{TDE}_{22} = \text{valor del TDE a } 22^\circ\text{C}$$

La alícuota para la medición de CE fue colocada en un tubo de ensayo. Se provocó la hemólisis de los eritrocitos para liberar la creatina contenida en su interior y ésta fue dosificada por el método de Griffiths, ligeramente modificado por Syllm-Rapoport.⁵

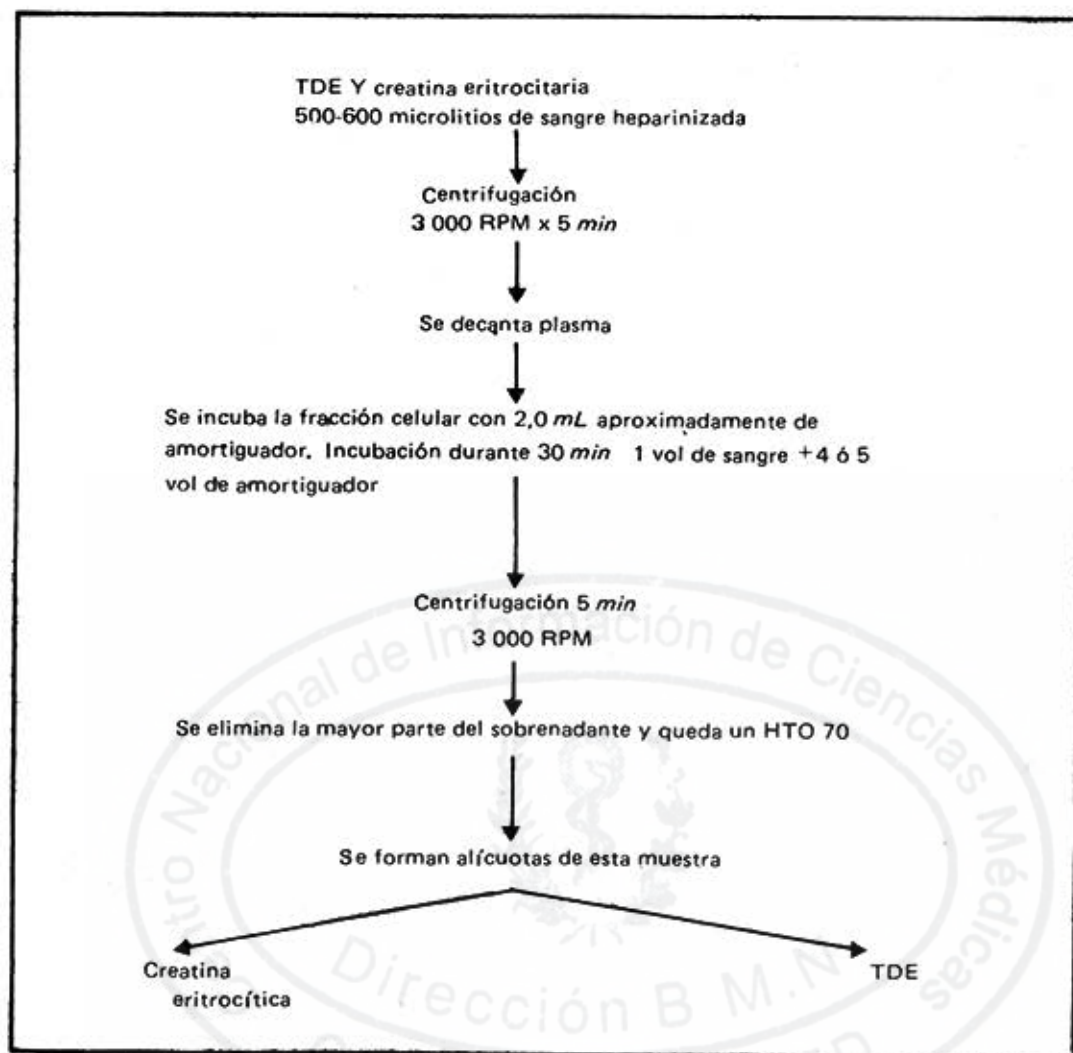


Figura 1.

El análisis estadístico⁷ incluyó análisis de varianza y *test* de Student, previa comprobación de homogeneidad de varianzas y análisis de correlación lineal simple. Todo el análisis estadístico fue llevado a cabo en una microcomputadora de la firma Sanyo, del CECAM.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los resultados del TDE y la CE realizados en los 3 grupos de recién nacidos estudiados. Aunque se señala que la edad de estos niños es de 0-3 días, la inmensa mayoría no fue mayor en edad de 48 horas. Antes de realizar las comparaciones binarias entre los 3 grupos, fue realizado un análisis de varianza en conjunto que mostró valores de F significativos, tanto para el TDE ($p < 0,05$) como para la CE ($p < 0,001$).

Como se puede observar en la tabla 1 los valores menores, tanto del TDE como de la CE correspondieron al grupo II, es decir, al de recién nacidos bajo peso y con Apgar

Tabla 1. Valores del test de densidad eritrocitaria (TDE) y la creatina eritrocitaria (CE) en niños de 0-3 días

Variable	Grupos		
	I N = 38	II N = 20	III N = 14
TDE (%)	6,26 ± 2,64	4,51 ± 2,07*	6,81 ± 2,50 ^Δ
CE mg/dL	10,70 ± 2,35	8,72 ± 2,95*	14,51 ± 4,59 ^Δ

*Valor significativo al comparar con el grupo I ($p < 0,01$).

Leyenda: ^Δ Valor significativo al comparar con el grupo II ($p < 0,01$).

Nota: Valores expresados como $\bar{X} \pm DS$.

considerado como normal, mientras que los valores más altos se obtuvieron en los niños del grupo III, que fueron los de Apgar ≤ 7 . Los valores de CE en este último grupo fueron significativamente más elevados que los hallados en los otros 2 grupos, mientras que el TDE fue sólo significativamente superior al comparar los grupos III y II.

Aunque el grupo III tiene incluido niños con peso $\geq 2\,500$ g y $< 2\,500$ g, es importante considerar que la mayoría de estos niños tuvo un peso inferior a 2 500 g (71 %).

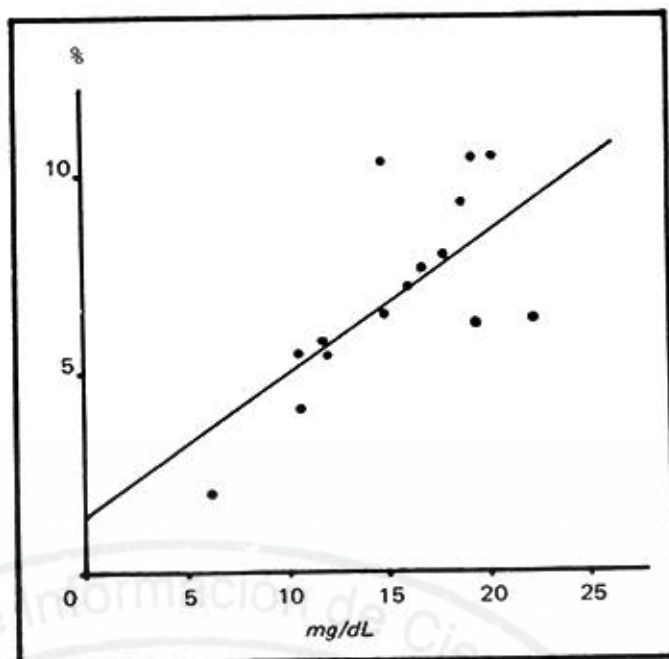
En la tabla II se muestran los resultados del estudio de correlación entre ambas variables TDE y CE en cada grupo; no resultó significativa esta correlación solamente en el grupo II.

La representación gráfica del estudio de correlación en el grupo III se muestra en la figura 2, donde se observa fácilmente la asociación de ambas variables a pesar de lo pequeño de la muestra.

Tabla 2. Estudio de correlación entre las variables test de densidad eritrocitaria (TDE) y creatina eritrocitaria (CE)

TDE = a CE + b				
Grupo	r	a	b	p
I	0,32	0,36	2,37	< 0,05
II	0,41	0,29	1,98	NS
III	0,67	0,37	1,45	< 0,01

Figura 2. Estudio de la correlación lineal del TDE (%) y CE (mg/dL) en niños asféticos (grupo 3).



DISCUSION

La eritropoyesis fetal durante los últimos meses del embarazo ocurre todavía en el hígado y en el bazo, además de tener lugar en la médula ósea.⁸ Este fenómeno fisiológico es regulado por la eritropoyetina, la cual en la vida fetal se produce principalmente en el hígado y más tarde en la vida posnatal es producida por el riñón.^{6, 9} Los eritrocitos del recién nacido, por otra parte, tienen varias diferencias en su composición y metabolismo, en relación con los del adulto.

Una de estas diferencias es que su tiempo de vida medio es más corto, de solamente 45-70 días.⁶ También es conocido que poco tiempo antes del nacimiento hay un aumento de la eritropoyesis. Este incremento es unas 3-5 veces los valores de la intensidad de la eritropoyesis del adulto. Esto se ve reflejado en el niño recién nacido por las cifras elevadas de hemoglobina al nacimiento y por la presencia en sangre periférica de células jóvenes de la serie roja, principalmente reticulocitos. Ha sido demostrado previamente que los eritrocitos jóvenes, al tener menor contenido de hemoglobina en relación con su volumen, poseen menor densidad que los eritrocitos más viejos;⁴ se conoce además que el contenido de creatina de los eritrocitos jóvenes es por otra parte mucho mayor (aproximadamente 10 veces mayor).⁶ Poco se conoce, por cierto, acerca de cómo es adquirida esta creatina por el eritrocito y que, con valores de 7,5 mg/dL de hemáties, supera la concentración de creatina plasmática también unas 10 veces. En algunos trabajos experimentales se ha determinado que la síntesis de este compuesto ocurre en el hígado y en el riñón principalmente, y a partir de estos órganos es incorporada al eritrocito por 2 mecanismos transportadores, difusión facilitada y transporte activo.

Teniendo el conocimiento de que en las situaciones de hipoxia se produce un incremento de la eritropoyesis, se ha planteado la hipótesis siguiente: en los niños recién nacidos que sufran hipoxia intraútero se debe observar aumento de las células de baja densidad en sangre periférica y aumento de los niveles de creatina eritrocitaria. Los resultados hasta ahora obtenidos parecen confirmar dicha hipótesis.^{4, 5, 10}

El primero de estos procedimientos, el TDE, es extraordinariamente simple y se basa en la determinación del porcentaje de células ligeras, en un tubo capilar, de los mismos utilizados para realizar el microhematócrito. Solamente es importante ser cuidadoso en la preparación de mezclas de ftalatos con la densidad requerida (1,088 kg/L) y evitar temperaturas del ambiente muy superiores a 22°C.

En particular el TDE ha demostrado mantener estrecha relación con algunas variables indicadoras del daño cerebral, en animales de experimentación, como la actividad de la acetilcolinesterasa, la relación proteína/DNA y la actividad de la anhidrasa carbónica en tejido cerebral.¹¹ También valores elevados del TDE muestran, según Gross *et al.*,¹² correlación estadística significativa con alteraciones psicomotoras detectadas a los 4-6 años de edad.

La dosificación de creatina eritrocitaria es una técnica bioquímica de relativa fácil introducción en cualquier laboratorio clínico de Neonatología.

En este estudio se pudo demostrar la coincidencia de los valores de ambas pruebas TDE y CE con lo informado en la literatura.^{4, 5}

Sin embargo, es un hallazgo nuevo la diferencia de valores para el TDE y la CE entre los grupos I y II, es decir, entre los niños con peso superior o igual a 2 500 g y los de menor peso, ambos con Apgar considerado como normal.

El grupo de niños con peso superior a 2 500 g tuvo también una edad gestacional promedio mayor, y ya fue mencionado que es en el último período del embarazo donde ocurre el mayor incremento de la eritropoyesis, lo cual explicaría los valores significativamente más altos de ambas pruebas en este grupo.

Sería interesante en un estudio futuro y con un mayor número de casos la clasificación con más precisión de los recién nacidos de los grupos I y II en pequeños para la edad gestacional, adecuados para la edad gestacional y grandes para la edad gestacional.

Los valores encontrados para el TDE en el grupo de niños con Apgar bajo no fueron más altos que los del grupo de niños con Apgar normal, pero con peso superior a 2 500 g; sin embargo, resultaron significativamente más elevados al compararlos con los del grupo de niños con Apgar normal, pero peso inferior a 2 500 g. Si se tiene en cuenta que en el grupo de niños con Apgar bajo el porcentaje de niños de bajo peso es muy alto (71 %), resulta lógico considerar que son más comparables este último grupo y el grupo de niños con Apgar normal, pero con peso bajo. Expresado de otra forma: de acuerdo con los resultados de este trabajo, los valores del TDE deben ser analizados también sobre la base de la edad gestacional.

La creatina eritrocitaria mostró valores medios mucho más elevados en el grupo de niños asfícticos que en los otros 2 grupos, lo que indica que se trata de una prueba más sensible que el TDE para la evaluación de la asfixia. Estos resultados deben ser confirmados con la ampliación del tamaño muestral y con la verificación futura en estos niños de posibles secuelas neurológicas y psicológicas, o la ausencia de éstas.

Como era de esperar, por el propio fundamento de ambas técnicas, existe una correlación bastante estrecha entre el TDE y la CE en los grupos I y III, hecho que no pudo ser demostrado en el grupo II. Hay que tener presente que el TDE es una prueba basada en un principio físico, mientras que la creatina eritrocitaria es una técnica puramente bioquímica.

En la perspectiva futura de este trabajo quedan por esclarecer numerosas interrogantes, entre las cuales una de las más importantes es, sin lugar a duda, conocer la evolución neurológica y psicológica de estos niños y la comparación de estos hallazgos con las 2 pruebas aquí presentadas.

SUMMARY

This study was carried out with the purpose of performing a preliminary evaluation, in our country, of possible usefulness erythrocytic density test and erythrocytic creatinine as indicators of perinatal asphyxia.

RÉSUMÉ

Cette étude visait à évaluer, en forme préliminaire dans notre pays, la possible utilité du test de densité érythrocytaire et la créatine érythrocytaire en tant qu'indicateurs d'asphyxie périnatale.

BIBLIOGRAFIA

1. Wolpe, J. J.: Perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Clin North Am* 23: 383, 1976.
2. Issel, E. P. et al.: Hypoxantine levels in amniotic fluid. *J Perinat Med* 10: 221, 1982.
3. *Berichte Humboldt Universität Zu Berlin*: Hypoxie und Hypoxiekrriterien Teil I und II. 24, 1982.
4. Lun, A. et al.: Dichtebestimmung roter Blutzellen als möglicher Siebtest zur Erfassung einer pränatalen Hypoxie. *Z Klin Med* 40(6): 429, 1985.
5. Syllm-Rapoport, I. et al.: Red cell creatine in term and preterm adequate and small for gestational age newborns after normal pregnancy or risk conditions. *Biomed Biochim Acta* 42(4): 359, 1983.
6. Syllm-Rapoport, I. et al.: Creatine transport into red blood cells. *Acta Biol Med Germ* 39: 771, 1980.
7. Daniel, W. W.: Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. New York, London, Ed. J. Wiley and Sons, 1974.
8. Klethanen, E.: Physiology of the perinatal period. V. 1. New York. Ed. Appleton Century Crofts, 1970. P. 225.
9. Surgener, D.: The red blood cell. 2nd. ed. New York, San Francisco, London, V. 2. Ed. Academic Press, 1975. P. 991.
10. Starck, R. et al.: Kreatinkonzentration roter Blutzellen bei Kinder mit angeborenen zyanotischen Herzmilbildungen. *Dt. Gesundh-Wesen* 34 Heft 15: 703, 1979.
11. Lun, A. et al.: The relations between erythrocytic and CNS parameters following postnatal hypobaric hypoxia of the rat. *Physiol Bohemoslovaca* 34: 111, 1985.
12. Gross, J. et al.: Dichtbestimmung roter Blutzellen als möglicher Siebtest zur Erfassung einer pränatalen Hypoxie. *Z Klin Med* 41 (4): 303, 1986.

Recibido: 11 de septiembre de 1986. Aprobado: 29 de enero de 1987. Dr. Pablo Cápiro León. Facultad de Medicina "Salvador Allende". Calzada del Cerro No. 1551, Municipio Cerro, Ciudad de La Habana