

11262

8
Zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA

DETERMINACION DE AMINOACIDOS Y HORMONA
DEL CRECIMIENTO EN PLASMA MATERNO Y EN
LIQUIDO AMNIOTICO DE FETOS CON
CRECIMIENTO NORMAL Y ANORMAL EN
DIFERENTES EDADES GESTACIONALES

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A :
EDGAR ARMANDO HERNANDEZ ANDRADE

TUTOR: DR. CARLOS VILLANUEVA DIAZ



MEXICO, D. F.

1999.

Per
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274250



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis esta dedicada a las mujeres que complementan y alegran mi vida.

A Rocío ; por ser mi apoyo mas importante, mi sostén mas fuerte y mi amor mas grande, sin ella no hubiera podido cumplir las metas que nos fijamos, gracias por compartir tu tiempo y tu vida conmigo.

A Aurora; por ser la generadora desde siempre de mi fuerza vital, el ejemplo a seguir y el mejor amor de madre que yo hubiera podido desear.

A María Fernanda; por haber nacido en plena búsqueda “científica” y por en este momento ser la felicidad mas grande de la vida.

A Citlali; por compartir su tiempo y por ser mi mayor motivo de orgullo y mi amor primero

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin el apoyo de las siguientes personas con las cuales estoy en deuda permanente y a las cuales agradezco de corazón, no solo por nuestra relación de trabajo sino también por nuestra relación de amistad.

Dr. José Roberto Ahued Ahued.

Dr. Carlos Villanueva Díaz.

Dr. José Luis Arredondo García.

Dr. Adalberto Parra Covarrubias.

Dra. Angela Sotelo

Dr. Fransisco Morales Carmona.

Psic. Rosalia Jiménez.

Mto. Ricardo Morales Carmona.

INDICE

I. ANTECEDENTES

Aminoácidos	1
Diferenciación por grupos y función	2
Aminoácidos maternos durante el embarazo	6
Transporte hacia el feto	9
Asociación al crecimiento fetal	13
Aminoácidos en líquido amniótico	17
Hormona del Crecimiento	19

II. JUSTIFICACION 22

III. METODOLOGIA

Planteamiento del Problema	24
Preguntas a Investigar	24
Hipótesis	25
Objetivos	26
Diseño	26
Cálculo del tamaño de muestra	27
Selección de la población	28

IV. MATERIALES Y METODOS

Crecimiento Fetal	29
Retraso en el Crecimiento Intrauterino	30
Mediciones hormonales	35
Descripción general del estudio	36
Recolección y análisis de la información	39
Requisitos éticos	39

V. RESULTADOS

Aminoácidos totales	40
Valores individuales de aminoácidos	41
Tendencias a lo largo del embarazo	43
Relación Plasma / líquido amniótico	44
Aminoácidos esenciales / no esenciales	50
Perfiles de aminoácidos de acuerdo a sus características bioquímicas	52
Perfiles de aminoácidos de acuerdo a su ingreso al ciclo de energía	56
Hormona del Crecimiento	58
Relación del Hormona del Crecimiento y los perfiles de aminoácidos	60

VI. DISCUSION	62
----------------------	-----------

VII. CONCLUSION	70
------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA

I. ANTECEDENTES.

Aminoácidos

Los aminoácidos (a.a.) tienen una importancia primordial en la vida de todos los organismos. Como constituyentes básicos de las proteínas comparten con ellas sus funciones y tienen por lo tanto un papel estructural y funcional dentro de la célula. Individualmente algunos actúan ya sea como neurotransmisores, como mensajeros en la secreción de hormonas o como substratos energéticos en la gluconeogénesis (1).

Los aminoácidos están formados por un carbono central, un grupo amino, un grupo carboxilo y un radical. Los radicales pueden variar en el sitio de unión con el carbono formando estereoisómeros o enantiómeros, los cuales son imágenes en espejo. Esta característica produce, al aplicar una fuente de luz polarizada, la difracción de la luz en una dirección determinada, los *l*-isómeros rotan la luz a la izquierda y los *d*-isómeros a la derecha. Todos los a.a. con excepción de la glicina tienen *l* y *d* isómeros, Sin embargo, todos los componentes de las proteínas en todos los organismos son *l*-isómeros (2).

<u>Nombre</u>	<u>Abr</u>	<u>S</u>
<u>Alanina</u>	<u>Ala</u>	<u>A</u>
<u>Arginina</u>	<u>Arg</u>	<u>R</u>
<u>Aspargina</u>	<u>Asn</u>	<u>N</u>
<u>Ac Aspart</u>	<u>Asp</u>	<u>D</u>
<u>Asn/Asp</u>	<u>Asx</u>	<u>B</u>
<u>Cisteina</u>	<u>Cis</u>	<u>C</u>
<u>Glutamina</u>	<u>Gln</u>	<u>Q</u>
<u>Ac Glutam</u>	<u>Glu</u>	<u>E</u>
<u>Gln/Glu</u>	<u>Glx</u>	<u>Z</u>
<u>Glicina</u>	<u>Gli</u>	<u>G</u>
<u>Histidina</u>	<u>His</u>	<u>H</u>
<u>Isoleucina</u>	<u>Ile</u>	<u>I</u>
<u>Leucina</u>	<u>Leu</u>	<u>L</u>
<u>Lisina</u>	<u>Lis</u>	<u>K</u>
<u>Metionina</u>	<u>Met</u>	<u>M</u>
<u>Fenilala</u>	<u>Phe</u>	<u>F</u>
<u>Prolina</u>	<u>Pro</u>	<u>P</u>
<u>Serina</u>	<u>Ser</u>	<u>S</u>
<u>Treonina</u>	<u>Tre</u>	<u>T</u>
<u>Triptofano</u>	<u>Trp</u>	<u>W</u>
<u>Valina</u>	<u>Val</u>	<u>V</u>
<u>Tirosina</u>	<u>Tir</u>	<u>I</u>

Tabla 1 Nombre y abreviatura en tres y una letra de los diferentes aminoácidos.
Diferenciación por grupos y función.

Aminoácidos esenciales/no esenciales.

Los a.a. también se pueden clasificar de acuerdo a sus características de carga eléctrica o a su capacidad de ser sintetizados dentro del organismo. De acuerdo a esta última clasificación, se definen como esenciales a aquellos que el organismo no puede producir y deben ser ingeridos en la dieta y como no esenciales a aquellos que pueden ser producidos en el organismo.

Dependiendo de la especie, cada a.a. puede variar entre esencial y no esencial, en el ser humano esta es la clasificación más aceptada (3):

Nombre	Abr	Nombre	Abr
Ácido Glutámico	Glu	Citrulina	Cit
Alanina	Ala	Ornitina	Orn
Arginina	Arg	Tirosina	Tir
Serina	Ser	Cisteina	Cis
Glicina	Gli	Ácido Aspártico	Asp
Prolina	Pro		

Aminoácidos no Esenciales

Nombre	Abr	Nombre	Abr
Lisina	Lis	Treonina	Tre
Valina	Val	Isoleucina	Ile
Histidina	His	Leucina	Leu
Fenilalanina	Phe	Metionina	Met

Aminoácidos esenciales

Grupos de Aminoácidos que Comparten Estructura Bioquímica:

Así mismo los aminoácidos también pueden ser clasificados de acuerdo a sus similitudes en su estructura bioquímica :

Aminoácidos asociados a los intermediarios del ácido-cítrico. - En este grupo se incluyen al glutamato, aspartato, alanina, arginina y citrulina los cuales pueden ser formados a partir de la transaminación de alfa-ceto-glutarato, oxalacetato y piruvato respectivamente.

La función principal de aspartato es como constituyente de las proteínas. Alanina es un transportador de carbonos provenientes del catabolismo proteico del músculo o del hígado en la vía metabólica del ciclo de alanina-glucosa.

El glutamato es probablemente uno de los aminoácidos más activo de acuerdo a su asociación con diversas rutas metabólicas, una de ellas es en la producción de energía a través de semialdehidos. Es también parte de los substratos en la neurotransmisión formando ácido aminobutírico y GABA aunque el mismo glutamato puede tener la misma actividad. Otra de sus funciones es la de sintetizar sistemas de conjugación dependientes de ATP en la formación de las enzimas y coenzimas del ácido fólico.

Arginina es un aminoácido básico, polar (cargado positivamente) el cual es un precursor en la producción de Óxido Nítrico (NO). Dicho camino metabólico se conoce como la ruta 1.-arginina-1-citrulina-óxido nítrico.

El óxido nítrico es producido en diferentes tejidos, a través de la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS) la cual requiere de la presencia de calcio para actuar. El NO es producido en la célula endotelial y pasa a la célula muscular lisa en donde promueve la transformación de Trifosfato de Guanosina (GTP) hacia Monofosfato de Guanocina cíclico (cGMP), el cual produce la relajación de la fibra muscular lisa y por consiguiente la vasodilatación (6,7).

Aminoácidos Sulfurosos.- En este grupo se incluye a cisteína (no esencial) y a metionina (esencial).

Existe evidencia que hace suponer que cisteína es siempre producido a partir de metionina. Este paso metabólico es indispensable en el transporte de los grupos sulfuros, cuando éste no se lleva a cabo se incrementa un producto intermediario, la homocisteína, que se elimina en forma abundante en la orina en la enfermedad metabólica llamada homocistinuria, la cual entre otras manifestaciones clínicas produce deficiencia mental y alteraciones en la visión.

La cisteína es importante dentro de las células, ya que produce un tripéptido (G-glutamil-cistein-glicina) que las protege reduciendo el número de peróxidos y radicales libres acumulados por los fenómenos de oxidación. También forma parte de una serie de enzimas que participan en la limpieza de sustancias llamadas xenobiotas, que son producidas por acción del citocromo P-450. Dichos productos involucran los residuos del metabolismo de los ácidos grasos y productos derivados del daño celular causado por radiaciones.

La metionina ha sido involucrada en diferentes procesos tanto en plantas como en bacterias, en estas últimas es fundamental para la quimiotaxis y en las plantas en la formación de ciclopropano. A su vez metionina está involucrada en la producción de poliaminas, las cuales tienen como una de sus funciones más importantes la estabilización en el interior de la célula, en la conformación de los ácidos nucleicos cargados negativamente, en la formación de la doble cadena de DNA y en la región de duplicación del RNA. La metionina, es también fundamental en la producción de S-adenosylmetionina (AdoMet), la cual está involucrada en los procesos de transmetilación de sustancias como epinefrina, fosfatidil-colina, creatinina y las bases metiladas del RNA de transcripción.

Aminoácidos Aromáticos.- En ellos se incluyen a fenilalanina, tirosina, triptofano e histidina. Histidina no es clásicamente un aminoácido aromático, Sin embargo, tiene una gran similitud en sus procesos metabólicos.

Entre dichos procesos en animales el más importante es la síntesis de tirosina a partir de fenilalanina y posteriormente la utilización de esta última en una serie de pigmentos y de hormonas.

Tirosina, triptofano e histidina son muy importantes en la síntesis de aminas biológicas, que son compuestos que funcionan como hormonas y como neurotransmisores.

La transformación de fenilalanina en tirosina se lleva a cabo bajo la presencia de una enzima llamada fenilalanina-hidroxilasa. Cuando esta conversión no se produce se presenta la enfermedad denominada fenilcetonuria, la cual si no es tratada adecuadamente puede producir retraso mental. Cuando el diagnóstico se realiza a tiempo, se puede iniciar una dieta rica en tirosina y baja en fenilalanina, permitiendo así el adecuado desarrollo del sistema nervioso.

Tirosina tiene una gran cantidad de actividades metabólicas, es parte fundamental en la producción de hormonas tiroideas y precursor de melanina y de catecolaminas.

Triptofano está involucrado en la producción de nicotinamida, y la deficiencia de esta da como consecuencia la enfermedad denominada pelagra.

La descarboxilación de histidina produce histamina, la cual tiene diversas funciones biológicas, entre las cuales se encuentran: la secreción de ácido clorhídrico y pepsina por el estómago. Es también un potente vasodilatador liberado en zonas traumatizadas o como parte de la reacción alérgica. La liberación en grandes cantidades de histamina produce una disminución de la presión arterial que puede llevar a la presencia de shock.

Aminoácidos con radical hidroxilo. Se incluyen a serina, glicina y treonina. Serina es muy activo metabólicamente, sobre todo en la formación de fosfolípidos y serina es el principal sustrato en la formación de coenzimas con tetrahidrofolatos. Glicina tiene un papel importante en la formación de glutatión y de nucleótidos púricos y porfirinas.

Treonina tiene como principal función el ser parte constitutiva de proteínas y de formar isoleucina en plantas y microorganismos.

Aminoácidos de cadena ramificada.- Se incluyen leucina, valina, isoleucina y lisina.

Leucina, isoleucina y valina son considerados aminoácidos cetógenos y están químicamente muy relacionados, comparten una serie de enzimas en su proceso catabólico, en ellos se ha identificado un control individual de sus funciones enzimáticas llamado control alostérico. Deficiencias en el metabolismo de estos a.a. debido a la falta del complejo enzimático alfa-cetoácido-deshidrogenasa produce su acumulación, eliminándose en la orina y dando el nombre a la enfermedad llamada orina de maple, esta entidad puede cursar con retraso mental. Su función en la célula es la de aportar sustratos energéticos muy parecidos a los ácidos grasos (4).

Relación de Aminoácidos con los Ciclos de Energía.

Existen dos formas en que los a.a. se asocian a los procesos energéticos, uno es la desaminación, bajo la cual el radical alfa-amino es convertido en urea y, el segundo, es la utilización de los esqueletos de carbono. La estrategia es la degradación de los aminoácidos y formar intermediarios que pueden ser

convertidos en glucosa y/u oxidados en el ciclo del ácido cítrico. De hecho los esqueletos de carbono de los diversos aminoácidos son convertidos en sólo 7 moléculas: piruvato, acetil coenzimaA, acetoacetil coenzimaA, alfa cetoglutarato, succinil coenzimaA, fumarato y oxalacetato. Esto es un ejemplo de la alta economía del organismo en sus conversiones metabólicas.

Los aminoácidos que son degradados a acetil CoA o a aceto-acetil CoA son llamados cetógenos debido a que incrementan los cuerpos cetónicos. Los aminoácidos que son degradados a piruvato, alfa cetoglutarato, succinil CoA , fumarato y oxalacetato son llamados glucogénicos. La síntesis neta de glucosa a través de estos a.a. es factible debido a que los intermediarios del ácido cítrico son convertidos en fosfoenol-piruvato y de ahí a glucosa. Los mamíferos no pueden convertir acetil CoA y aceto-acteil CoA hacia glucosa.

De los 20 aminoácidos leucina y lisina son puramente cetogénicos, isoleucina, fenilalanina, y tirosina son mixtos; cetógenos y glucogénicos. Los otros 15 aminoácidos son considerados puramente glucogénicos.

En las características de sus esqueletos de carbono se encuentra sus vías de entrada al ciclo del ácido cítrico, así se identifican seis grupos:

Grupo que se incorpora como Acetil Coenzima A: leucina y lisina.

Grupo Mixto Cetógeno y Glucogénico- Isoleucina, tiroxina, y fenilalanina.

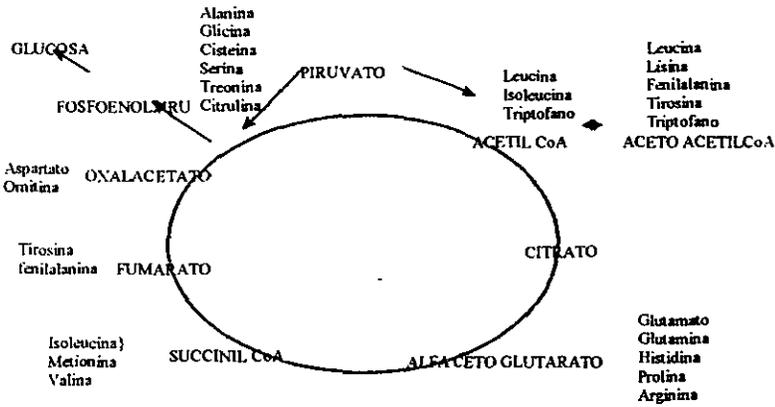
Grupo que se incorpora a través de piruvato con esqueleto de tres carbonos en ellos se identifican a alanina, glicina, cisteina, serina y triptofano.

Grupo que se incorpora a través del oxalacetato y que aportan cuatro carbonos en su esqueleto: aspartato y ornitina.

Grupo que se incorpora a través de alfa-ceto-glutarato y aportan cinco carbonos en su esqueleto: histidina, ácido glutámico, prolina, arginina y citrulina.

Grupo que se incorpora a través de succinil CoA: valina y metionina (6).

Esqueletos de carbono de los diferentes a.a. v su ingreso al ciclo del ácido cítrico



Aminoácidos maternos durante el embarazo.

La concentración plasmática de los aminoácidos se mantiene dentro de límites estrechos en un compartimento virtual al que se le denomina "poza metabólica". Esta varía en cada especie y dentro de la misma especie dependiendo de la edad, o condiciones fisiológicas. Los aminoácidos libres en plasma constituyen la fuente principal para la utilización, de acuerdo a su requerimiento específico, por los diferentes tejidos del organismo. Las diferencias en la tasa de captación de estos aminoácidos por los tejidos establecen cambios en las concentraciones intra y extracelulares de cada uno de ellos (10,11,12).

Durante el embarazo la madre es la encargada de suministrar los a.a. necesarios para el desarrollo fetal, placentario, y el crecimiento de las estructuras maternas (aumento del tamaño del útero, aumento del volumen sanguíneo), dichos a.a. libres provienen de la "poza" en plasma (13,14,15). Cuando se han comparado los niveles de a.a. entre mujeres embarazadas y no embarazadas, se han encontrado valores más altos en estas últimas, la presencia de embarazo al parecer disminuye los niveles plasmáticos de a.a. (16,17,18,19). Cuando el análisis se realiza en base al porcentaje de aminoácidos esenciales y no esenciales a pesar de que la cantidad total de a.a. es mayor fuera del embarazo, pareciera existir un aumento en los no esenciales en sangre de mujeres embarazadas, respondiendo tal vez a las necesidades fetales y placentarias. Sin embargo, a pesar de este cambio en la proporción de a.a., se mantienen los mismos principios, esta "poza" de aminoácidos trata de permanecer siempre constante. Así entonces se ha llegado a considerar que los a.a. que no pudieran ser

aportados en la alimentación, son extraídos de las proteínas estructurales maternas para mantener la "poza" de aminoácidos libres (20).

La alimentación materna es considerada uno de los factores que más pueden influir en el crecimiento fetal (20,21,28). En ovejas en las cuales se restringe la dieta, se ha observado una disminución en el crecimiento fetal y en la ganancia de peso materno (18,19). Cuando dicha restricción es selectiva disminuyendo sólo los a.a. se reduce también el crecimiento fetal y se limita el aumento de peso materno (20,22,56). Cuando se produce restricción alimentaria antes del embarazo la probabilidad de desarrollar retraso en el crecimiento fetal es aún mayor y cuando dicha restricción es durante el embarazo los efectos encontrados dependerán de la edad gestacional en que se presente, aunque la posibilidad de disminuir el potencial de crecimiento es menor.

La captación de a.a. por el embrión/feto depende de los siguientes factores: ingesta materna, del sistema de absorción y transporte placentario y de la distribución fetal. Cualquier alteración en alguno de dichos procesos, tendrá como repercusión una falta de desarrollo placentario y/o fetal normal.

La falta de aporte de nutrientes hacia el feto se manifiesta como una disminución en el crecimiento y muy probablemente en una alteración en el desarrollo. Este retraso puede ser armónico cuando se afecta la totalidad de los segmentos fetales o disarmónico cuando algunos son más afectados que otros. La falta de crecimiento se puede diagnosticar por medio del Ultrasonido y se denomina Retraso en el Crecimiento Intrauterino (RCIU). Dicho diagnóstico se realiza comparando las mediciones de las diferentes estructuras fetales con los valores de referencia de las mismas estructuras obtenidos en la población general. Si dichos valores se encuentran por debajo de dos desviaciones estandar ($\leq 2ds$) se realiza entonces el diagnóstico de RCIU. Dicha entidad es la complicación más frecuentemente asociada al embarazo y generalmente es secundaria a la disminución en el aporte de nutrientes y oxígeno (23,24).

Se ha pensado que la glucosa es el sustrato energético más importante para la placenta y el feto; sin embargo, no sólo proviene de la concentración plasmática materna, sino también del catabolismo de a.a. glucogénicos. Es probable que debido a la diversidad en las funciones metabólicas de los a.a., éstos tengan una mayor utilidad durante el embarazo que la propia glucosa. A su vez es conocido también que más de la mitad de la glucosa que transporta la placenta es utilizada localmente, muy probablemente por los sistemas activos que consumen energía y que requieren del sustrato directo (25,26).

Entre dichos procesos activos, el transporte de a.a. es uno de los que más genera gasto energético, muchos de los a.a. son liberados a la circulación fetal en donde por diversas vías pueden ser incorporados a las diferentes estructuras o metabolizados como fuente alterna de energía.

La desnutrición materna se ha postulado como una de las causas más frecuentemente asociadas al RCIU, Sin embargo, a pesar de la desnutrición se modifican pocos los valores de la "poza" de a.a. la cual se trata de mantener constante a través del embarazo. Sólo cuando dicha desnutrición es muy severa los valores se modifican. Se ha observado una relación importante entre el aumento de peso materno y el aumento de peso fetal, las madres que ganan poco peso durante la gestación tienen una mayor posibilidad de desarrollar fetos de bajo peso (18,19).

La estabilidad de la "poza" de aminoácidos se ha observado en seres humanos en poblaciones con bajo ingreso económico y por lo tanto con una probable disminución del aporte proteico, en las cuales no se han encontrado diferencias en los valores plasmáticos de a.a. cuando son comparados con mujeres de un mayor ingreso económico (27).

La posibilidad de que la "poza" de a.a. se afecte por una mala nutrición ha llevado a establecer modelos de experimentación en los cuales se restringe de una forma severa la dieta. En ellos no se han encontrado modificaciones en los a.a. maternos a pesar de tener como resultado una falta de ganancia de peso durante la gestación y un menor peso en el feto al nacimiento (19,28,56).

En ratas embarazadas bajo una severa restricción alimentaria, se ha observado una lisis proteica, sobre todo de los músculos abdominales, del riñón y del hígado, probablemente para tratar de mantener los niveles de a.a. constantes, de hecho algunos aminoácidos se encuentran por arriba de los valores de los controles (20,56).

Lo anterior ha dado como resultado que se cuestione acerca de la restricción alimentaria como único condicionador del retraso en el crecimiento. Otros investigadores han suprimido de la dieta sólo a los aminoácidos, manteniendo el aporte calórico normal, el resultado ha sido una disminución en la ganancia de peso materno y una disminución en el peso de los recién nacidos, Sin embargo, los valores del aminograma tanto materno como fetal permanecen constantes (20).

Es probable que los sistemas de control del organismo tiendan a mantener estos valores dentro de límites muy estrictos de esta forma los procesos metabólicos se llevan a cabo normalmente. Entre ellos es la presencia de embarazo, dadas las condiciones de seguridad con las que trabaja el organismo, en casos de restricciones severas en la dieta, que modifiquen los a.a. circulantes, la mayoría de los procesos metabólicos no son llevados a cabo normalmente y por lo tanto es casi improbable encontrar un embarazo. Así mismo en casos de restricción severa durante el embarazo, tanto la unidad feto-placentaria como la madre ponen en marcha los mecanismos adaptativos, entre los cuales se puede incluir la movilización de proteínas estructurales, incremento en los sistemas de transporte placentario e ingresos a diversas rutas metabólicas de los diferentes substratos.

No han existido por lo tanto resultados que muestren alguna diferencia consistente entre los valores maternos de aminoácidos en fetos con crecimiento normal y anormal, las diferencias individuales se pueden atribuir a cambios en la dieta de las madres o aún en cambios en el momento de la toma de la muestra.

Así mismo, estudios retrospectivos en seres humanos han mostrado que la desnutrición materna se asocia frecuentemente a otras complicaciones como enfermedad hipertensiva asociada al embarazo, enfermedades de la colagena, infecciones, etc. Es muy difícil establecer el efecto individual de cada uno de ellos en la génesis del RCIU (23,24).

Transporte hacia el feto.

El paso de nutrientes hacia el feto es un punto crucial en el desarrollo, las primeras divisiones del cigoto son muy lentas debido a que existe una alta transferencia de información y un alto grado de metabolismo proteico. No hay datos disponibles acerca de la utilización o aporte de nutrientes durante el viaje del cigoto a través de la trompa de falopio.

A la llegada al útero los nutrientes son aportados por el endometrio, el cual se ha preparado para este fin. Se han encontrado en las primeras semanas de gestación sistemas de intercambio activo entre el embrión y la madre, estos mecanismos de transporte son realizados por medio de pinocitosis en las células del saco de *Yolk*, las concentraciones encontradas en esta estructura parecen corresponder a un reservorio de proteínas para los primeros estadios del embarazo (29,30,25,21,31,32,33).

Al inicio de la gestación dos espacios diferentes se desarrollan, el extracelómico que se encuentra en contacto directo con la sangre materna, con la membrana amniótica, y con el saco de *Yolk* y el espacio amniótico el cual esta en contacto con el embrión, el saco de *Yolk* y el espacio extracelómico. A medida que el embarazo avanza el espacio extracelómico va disminuyendo y el amniótico se incrementa. El líquido extracelómico al parecer está formado por un ultrafiltrado del plasma materno y las concentraciones de a.a. en su interior son muy altas, aún más altas que las maternas (25,29,30). De tal forma que los a.a. tienen que ser transportados hacia el espacio extracelómico y de ahí al embrión en contra de un gradiente de concentración, lo cual implica mecanismos activos en las células de la membrana coriónica. Este espacio extracelómico es el contacto que el embrión tiene con los productos maternos para captarlos y requiere de la superficie de contacto de la membrana amniótica y de la membrana del saco de *Yolk*. Esta última se encuentra en contacto directo con ambos líquidos y se han descrito datos no sólo de absorción sino también de secreción a través de ella (25,29,30,34).

Esta capacidad secretora de la membrana del saco ha puesto en duda el hecho de que todos los aminoácidos encontrados en ambos líquidos; amniótico y extracelómico, sean provenientes de la madre. De la misma forma los mecanismos de transporte a través de la membrana amniótica no han sido explicados.

Las características físicas y químicas de los líquidos extracelómico y amniótico difieren grandemente, en el primero la consistencia es más densa y con una muy alta concentración de nutrientes. Dicha concentración se modifica durante el primer trimestre del embarazo declinando hacia la 10 semana. Sus características dependen de la permeabilidad de la membrana coriónica y posteriormente del grado de funcionamiento placentario (29,30,35). Los valores de aminoácidos no han podido ser evaluados antes de la semana 10 de embarazo debido a que no es posible la toma de muestras a esa edad gestacional. Sin embargo, a partir de dicha semana se ha encontrado también una alta concentración de a.a. generalmente menor que en líquido extracelómico, pero mayor que la materna. Sorprendentemente dichas concentraciones en ambos espacios tienen la misma distribución de aminoácidos que el plasma materno (25,29,30,34,35).

Durante las primeras semanas, la alta concentración de a.a. parece responder a las necesidades en la formación de las diferentes estructuras embrionarias y placentarias, muchas de ellas se encuentran en contacto directo con el líquido amniótico y con los nutrientes que contiene. No existe ninguna información acerca de la contribución del líquido amniótico en la formación de las estructuras.

Conforme avanza el embarazo los mecanismos reconocidos de transporte de aminoácidos por la placenta se relacionan con el consumo de energía, y están asociados a sistemas activos como la bomba de sodio/potasio, esto les permite ser transportados aún en contra de gradientes de concentración (36,37). Dado que sus concentraciones en sus diferentes compartimientos no guardan una relación directa con la concentración materno/fetal, el transporte parece depender, en cierta medida, de la presencia de señales hormonales, fetales y placentarias.

Todos los precursores metabólicos son aportados por la sangre materna hacia el espacio intervelloso a través de las arterias espirales, a su vez, estas arterias tienen la capacidad de modificar su calibre de acuerdo al control de sus células endoteliales. Estas células endoteliales provienen del cito-trofoblasto son capaces de invadir los vasos maternos y modificar el tono vascular variando así la perfusión placentaria (38).

Esto último ha sido investigado en base a la actividad del óxido nítrico producido por estas células en respuesta a diferentes estímulos. Dichos estudios en cotiledones de placenta perfundidos a los cuales se les controla el flujo de fluido en su interior, han mostrado que los cambios que se producen en el calibre de los vasos tienen asociación a la actividad del óxido nítrico (39). Así

mismo en preparaciones de tejido en los cuales se miden los productos finales de la ruta del óxido nítrico, se han encontrado valores diferentes cuando son comparadas placentas de mujeres sin complicaciones en el embarazo y en mujeres que desarrollaron preeclampsia (40). Si bien no ha sido posible establecer la conclusión definitiva de que el óxido nítrico es el único factor involucrado en este fenómeno, es muy probablemente uno de los más importantes. Ya se ha mencionado que en el fenómeno de liberación de óxido nítrico está involucrada la conversión de l-arginina a l-citrulina como un paso fundamental.

De tal forma que dicha invasión trofoblástica y su posterior diferenciación en células endoteliales es fundamental para asegurar la perfusión del espacio intervilloso y la disponibilidad de nutrientes hacia la placenta y feto.

En el lado fetal de la placenta la vellosidad terminal está formada por un capilar sanguíneo fetal y estroma, el capilar está revestido en su parte interna por una capa de células endoteliales y una membrana basal y en la parte externa por sincitio-trofoblasto. Es en estas células, en donde se dan los pasos activos en el transporte de aminoácidos (25,41,42). Los valores de a.a. en la célula trofoblástica sobrepasan por mucho los valores en sangre materna y fetal. Al parecer los mecanismos de transporte actúan en la captación de los a.a. de la sangre materna, transportándose a través de la célula y liberándose a la circulación fetal, es en esta ruta en donde los a.a. pueden tomar diversos caminos.

La naturaleza mono-hemo-corial de la placenta humana establece dos circulaciones separadas, la fetal constituida por la vellosidad terminal y separada a través de las células del sincitio-trofoblasto y la materna que forma lagos en los espacios intervillosos que rodean completamente a la vellosidad en una gran superficie de intercambio.

La forma ramificada de las vellosidades coriales, le permite estar en íntimo contacto con la circulación materna. Las células del sincitio-trofoblasto y muy probablemente otros componentes del estroma de la vellosidad corial tienen la función de controlar el tono de los vasos fetales. Esta capacidad de transporte de nutrientes a lo largo del embarazo se incrementa en relación a la disminución en el grosor de la barrera de la vellosidad y a un aumento simultáneo del riego sanguíneo materno y fetal (38).

La producción hormonal de estas células le confieren cierta capacidad de controlar el metabolismo materno, dicha producción incluye la gonadotropina coriónica, progesterona, lactógeno placentario, hormona del crecimiento variedad placentaria y factores de crecimiento parecidos a la insulina (43,44,45,46). Algunas de estas hormonas, como se discutirá más adelante, parecen tener efecto en el control de algunos procesos metabólicos maternos permitiendo el aporte constante de nutrientes de acuerdo a las necesidades de la unidad feto-placentaria. Así mismo la gran actividad metabólica de las células trofoblásticas

incrementa el consumo de substratos sin que ellos lleguen directamente al feto. Este último puede desarrollar sistemas de síntesis de aminoácidos ya sea para su propia utilización o para suministrarlos a la placenta.

Algunas de las hormonas producidas en las células trofoblásticas son solamente liberadas a la circulación materna, sus actividades no están plenamente identificadas, Sin embargo, no es muy lejano pensar en que la placenta toma cierto "control" del metabolismo materno (45,47,74).

En la vellosidad terminal se manifiestan una serie de mecanismos de transporte de a.a.. El sistema A que transporta alanina, glicina, serina, prolina, treonina y glutamina; el sistema L que transporta leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, alanina, serina, treonina y glutamina; y el sistema ASC que transporta preferentemente alanina, serina, treonina y glutamina. Sin embargo, a pesar de que ha existido un avance en la información relacionada con los transportadores de a.a., actualmente son poco conocidos y entendidos estos mecanismos.

Parte de esta confusión nace en que cada uno de los transportadores es capaz de llevar a varios a.a., y que no son específicos para ninguno de ellos. La caracterización molecular de cada transportador es muy difícil de establecer y tampoco es posible localizar el sitio genético de expresión. Por lo tanto es difícil identificar los cambios específicos en ellos asociados al retraso del crecimiento intrauterino. Los transportadores de a.a. consumen energía, esto se manifiesta por las altas tasas de utilización de glucosa por la placenta. Cada aminoácido tiene diversas opciones para ser transportado ya sea en condiciones de hipoglicemia/normoglicemia y en presencia o ausencia de insulina. La posibilidad de contar con diversas rutas de transporte bajo diferentes circunstancias establece su importancia para el feto y la placenta, al tratar de mantener un abastecimiento continuo.

Es probable que los diferentes sistemas actúen bajo diversos estímulos a lo largo del embarazo acordes al grado de producción hormonal y de maduración orgánica del feto (36,41).

Existen reportes acerca de la generación de aminoácidos no esenciales por medio de la placenta y de la presencia de ciclos de conversión de urea dados por el alto consumo de a.a. Esto último permite inferir una relación independiente entre las necesidades de la placenta y fetales en la producción-transporte de aminoácidos.

Con los trabajos del Dr. Battaglia y cols., se han logrado identificar altas relaciones entre los órganos fetales y la placenta que modifican el transporte de aminoácidos. Dichos estudios han llevado a la conclusión de que el transporte de aminoácidos en la placenta puede no sólo representar las necesidades fetales

pero si las placentarias. De esta forma, una gran cantidad de los nutrientes que son tomados de la circulación materna son utilizados localmente, sin que lleguen a la circulación fetal. El hígado fetal tiene notable influencia sobre este proceso y se hace aparente en el ciclo identificado como glicina-serina, en el cual la glicina es captada totalmente en el hígado y es utilizada para producir serina, esta es liberada a la circulación fetal, la serina tomada de la circulación materna se utiliza totalmente en la placenta.

En el ciclo Glutamina-Glutamato el hígado fetal capta casi toda la glutamina circulante y produce glutamato que es utilizado en la placenta, el glutamato transportado de la circulación materna pasa a la circulación fetal (26,48,49,50,54).

De tal forma que la información actual parece orientarnos a la identificación de áreas con sus propios sistemas de control y que no dependen únicamente de los valores circulantes maternos.

Asociación con el Crecimiento Fetal

Bajo el concepto de que la mujer embarazada es el principal sustrato de aminoácidos al feto, durante mucho tiempo se consideró que todos ellos provenían sólo de dicha fuente, esto hasta cierto punto es válido al principio del embarazo y parece modificarse después. Si bien es ella el único medio de aportar a.a. exógenos, esto no significa que los aminoácidos fetales y placentarios provengan completamente de la madre. Lo anterior ha sido comprobado en animales de experimentación en los cuales se inyectan a.a. marcados a la circulación materna y éstos no son encontrados en tejidos fetales. En 1999 Jozwick describe un modelo de infusión materna de a.a. y la medición subsecuente de éstos en el feto, no se observan modificaciones en los valores fetales, de hecho se observan disminuciones en algunos de ellos (51).

De tal forma que la primera fuente de proteínas es la circulación materna, el feto puede desarrollar a lo largo del embarazo sus propios sistemas de control y producción de aminoácidos, lo cual modifica el concepto de una relación directa entre los niveles maternos y fetales.

Cuando se han comparado los valores obtenidos en estudios observacionales en seres humanos con trabajos de experimentación en animales de laboratorio los resultados no han sido los mismos ya que aún en situaciones de laboratorio muy severas no se observan los cambios reportados en el feto humano (52).

Lo anterior también puede deberse a dos factores, uno de ellos postulado por Woods (52) en el cual menciona que las diferentes especies de animales pueden tener diferentes "apetitos" por el mismo nutriente. Así se ha observado que en carnívoros hembras embarazadas a las cuales se les infunde con una solución de a.a., el nivel de captación placentaria es mucho más alto que en ovejas, el mismo autor menciona que tales diferencias de género pueden estar presentes en

los humanos y que los cambios en un animal herbívoro, como en la oveja, no representan realmente los cambios observados en el ser humano.

En la práctica clínica se ha considerado como una de las probables explicaciones del retraso en el crecimiento intrauterino a la "insuficiencia placentaria", dicho término es inespecífico y trata de englobar a todas las circunstancias en las cuales el funcionamiento placentario se encuentra afectado.

Es probable que durante el proceso de evolución y maduración placentaria se presenten diversos agentes lesivos que puedan comprometer su función. Estos pueden estar presentes aún desde el momento de diferenciación del sincitio-trofoblasto, al momento de tomar el control endotelial de las arterias espirales maternas, o como infecciones y agresiones químicas que pueden alterar los sistemas de transporte. Cada uno de los diferentes mecanismos de agresión se puede traducir en un inadecuado funcionamiento placentario aumentando la posibilidad de repercusión a la unidad feto/placentaria (23,24).

Esto ha dado como consecuencia que en la búsqueda de la aplicabilidad clínica a este término (RCIU), se identifiquen ciertas etapas en el embarazo en las cuales la restricción del crecimiento fetal se hace más aparente y de esta forma sea más sencillo establecer el diagnóstico.

Sin embargo, es muy probable que la agresión se haya presentado mucho antes y que al momento del diagnóstico sólo se esté en presencia de una manifestación clínica tardía. Cuando estos factores actúan a partir de la segunda mitad del embarazo, los sistemas de protección feto/placentarios desarrollados normalmente al inicio de la gestación le confieren una alta capacidad de adaptación y protección reduciendo así su riesgo.

Cuando dichos agentes lesivos se presentan desde las primeras etapas del embarazo (cromosomopatías o infecciones) se modifican los sistemas de protección de tal forma que los efectos secundarios en el feto se manifestarán desde el inicio del embarazo. Es en estos casos es en los que se puede encontrar una alteración muy temprana en el crecimiento y un muy mal pronóstico (23,24,53,64).

Desde el inicio del embarazo el feto posee notables requerimientos nitrogenados, aunque no se disponga de datos cuantitativos precisos sobre la tasa metabólica y el flujo unidireccional de los a.a., parece ser que al menos en la oveja el aporte neto de a.a. excede como mínimo 2 ó 3 veces a las necesidades de incorporación de proteínas. El crecimiento placentario, los sistemas enzimáticos y la producción local de hormonas justifican este incremento en la tasa de utilización de aminoácidos, así mismo la posibilidad de acceder a diversas rutas en la producción de energía parecen también justificar que sus concentraciones sean altas (55).

Es posible por lo tanto inferir que casi todos los aminoácidos en líquidos embrionarios y fetales provienen de la madre. Sin embargo, algunos son producidos por el mismo feto y/o placenta. Así entonces sus valores y orígenes dependerán del sitio donde se realice la medición. La vena umbilical representa en general la absorción de a.a. a través de la placenta y la arteria umbilical manifiesta los aminoácidos contenidos en la poza fetal. Es importante puntualizar esta diferencia, ya que a pesar de que la proporción de aminoácidos es muy constante y con pocas variaciones, los valores pueden cambiar dependiendo del lugar en donde se lleve a cabo la medición (58).

En muestras de sangre fetal obtenidas por cordocentesis se han comparado los perfiles de aminoácidos en fetos con crecimiento normal y anormal, las concentraciones de la mayoría de los a.a. son más elevadas en la sangre fetal que en la materna. Se ha postulado que la concentración de alfa amino-nitrógeno en sangre arterial está disminuido en fetos con RCIU, y la mayor parte de esta diferencia se debe a las menores concentraciones de a.a. de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) (55,59,60). En otro estudio se registró un aumento en alanina y disminución en serina y tirosina. Los cambios en los a.a. parecen tener alguna relación con el grado de hipoxemia fetal (58). En otros trabajos se ha mencionado que el cociente plasmático entre los a.a. no esenciales y los esenciales está aumentado en el retraso en el RCIU, lo que al parecer apoya la hipótesis de que puede ser reflejo del aumento neto del desdoblamiento de proteínas fetales o placentarias (61).

De los a.a. los de cadena ramificada y en especial leucina es el que más ha mostrado una diferencia entre fetos con crecimiento normal y anormal. Esto ha dado como resultado que diversos investigadores se pregunten cuál es la importancia de este a.a. en el crecimiento fetal normal. Los aminoácidos de cadena ramificada son esenciales para el metabolismo oxidativo y para la síntesis de proteínas. Cuando existe una disminución del aporte energético materno, el metabolismo de leucina se incrementa rápidamente (11, 53,55,62).

Sin embargo, los verdaderos mecanismos por los cuales los a.a. de cadena ramificada influyen en el crecimiento fetal no son claros, los cambios en la permeabilidad en el sincitio-trofoblasto o en la interface del endotelio pueden ser un mecanismo. Una placenta alterada con modificaciones en el metabolismo oxidativo puede limitar también la disponibilidad de a.a. (55,61,62,63).

Algunos reportes han mostrado que la concentración de a.a. se encuentra significativamente disminuida en fetos con retraso en el crecimiento, al momento de la cordocentesis y al momento del trabajo de parto, aún cuando el nacimiento sea por vía abdominal.

Otros autores mencionan que en fetos con RCIU a los cuales se les toma muestra sanguínea por cordocentesis a las 26 semanas, la concentración venosa

plasmática de los tres aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina está notoriamente disminuida (11). Dicha reducción aparentemente es independiente de la severidad clínica del RCIU y puede reflejar la presencia de una alteración temprana en los sistemas de transporte placentario de a.a.

Existen reportes en los cuales las concentraciones sanguíneas en madres con fetos con RCIU muestran un aumento significativo en los siguientes valores: lisina, histidina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, arginina, alanina y tirosina cuando son comparadas con los valores de madres con fetos con crecimiento normal, del mismo modo el alfa-amino-nitrógeno también está aumentado, Sin embargo, ha sido muy difícil reproducir tales resultados y las variaciones individuales muestran poca consistencia (58).

Algunos aminoácidos han mostrado un comportamiento peculiar durante el período gestacional, muy probablemente por las diversas funciones en las cuales están normalmente involucrados.

Ya se ha mencionado a leucina como uno de los más representativos, su grado de oxidación a la mitad de la gestación es tan alta como al final, mostrando aparentemente que su aporte en carbonos para la oxidación a lo largo del embarazo es continua. Leucina puede también estar implicada en diversos ciclos placentarios al tener aquí una función elevada de su aminotransferasa específica. Finalmente la cantidad de leucina que es transportada por la placenta es mayor a la requerida para la síntesis de proteínas en el feto suponiendo otras acciones para este aminoácido como pueden ser el de sustrato primario de energía en la misma placenta (27,55).

La importancia de arginina ha sido últimamente descrita en animales de experimentación en los cuales se inhibe la producción de óxido nítrico a través del antagonista de l-arginina; N-nitro-l-metil éster de arginina (L-NAME) se produce un incremento en la resistencia de los vasos, aumento de la presión arterial y retardo en el crecimiento intrauterino (59).

Así mismo en animales de experimentación en los cuales se disminuye la producción de NO y se desarrolla retardo en el crecimiento, la suplementación posterior con L-arginina revierte dichos efectos y el grado de daño tisular. Estos mismos resultados se han encontrado en estudios en los cuales se restringe la dieta y la concentración de oxígeno y posteriormente se suplementa a un grupo con l-arginina y a otro no, el efecto en el daño endotelial y en la génesis del retraso en el crecimiento es mayor en los que no están suplementados con l-arginina (64). Sin embargo, estos efectos no han podido ser comprobados en humanos, en donde sólo se observa después de que ya se encuentra presente el retraso en el crecimiento que la suplementación con l-arginina mejora el flujo vascular medido por Doppler, pero no revierte el retraso en el crecimiento (65). También el efecto vasodilatador de los estrógenos

durante el embarazo parece ser mediado al menos parcialmente por óxido nítrico.

Aminoácidos en líquido amniótico.

A lo largo del tiempo el líquido amniótico se ha considerado un producto enteramente fetal, Sin embargo, no se puede descartar cierto aporte de la membrana amniótica. Dicho epitelio es capaz de secretar pequeñas cantidades de líquido. Su contribución en el control y regulación del líquido amniótico no ha sido estudiada.

La composición del líquido amniótico varía de acuerdo a la edad gestacional y al grado de maduración fetal, a partir de la 16 semana de gestación la contribución de la orina es mayor al 95%, el resto está formado a partir de un transudado de la piel, del cordón umbilical y del tubo digestivo, conforme avanza el embarazo el aporte del líquido tráqueo-pulmonar es cada vez mayor llegando a constituir al final del embarazo hasta un 20% del total. El reciclaje del LA se lleva a cabo a través de la ingesta fetal, en el cual el líquido pasa al tubo digestivo, dicho reciclaje se da en un tiempo aproximado de 3 horas.

La constitución del líquido amniótico es a partir de agua en un 98%, ácidos grasos, pigmentos biliares, proteínas y carbohidratos (66). Dicha variedad en su contenido ha dado la posibilidad de utilizarlo como medio en la vigilancia del estado de salud fetal identificando sustancias producidas por el feto y expulsadas hacia el líquido. El correcto funcionamiento del riñón y del sistema digestivo fetal se manifiestan en términos generales con una adecuada cantidad de líquido amniótico medida por ultrasonido (66).

Debido a la idea de que representa al estado fetal, el análisis del líquido amniótico obtenido por medio de una punción a través del abdomen materno invadiendo el ambiente fetal, ha sido el procedimiento invasivo más frecuentemente utilizado en la evaluación del embarazo. A través del LA tomado por amniocentesis es posible evaluar el grado de maduración pulmonar midiendo los ácidos grasos producidos en los alveolos, los cromosomas y el funcionamiento génico en las células fetales, determinar los niveles de bilirrubinas y así establecer si los valores de eritrocitos se encuentran dentro de lo normal, medir hormonas y relacionarlas con la presencia de defectos congénitos o de cromosomopatías. La amniocentesis se ha utilizado también para valorar la presencia de nutrientes, los aminoácidos han sido identificados en el líquido amniótico en todas las edades gestacionales (67).

Lo anterior llevó a la conclusión de que los aminoácidos en líquido amniótico eran una representación de los valores fetales, se hicieron intentos de correlacionarlos con el crecimiento fetal sin mucho éxito por su tendencia a mantener sus valores muy constantes a pesar de lo dinámico de su

intercambio. O Neil y cols., puntualizan los mínimos cambios del aminograma en líquido amniótico después del sexto mes de embarazo, en donde a pesar del crecimiento fetal, los valores permanecen constantes. (68).

Esta posibilidad de que el líquido amniótico representara un real estado fetal hizo que se utilizara en el diagnóstico de enfermedades metabólicas, asociadas a alteraciones en los a.a. Así, se intentó correlacionar con la enfermedad de orina de sabor de maple y la fenil-cetonuria, ninguna de las evaluaciones ha mostrado éxito en la predicción de la enfermedad (69).

Lo anterior llevo a Gitlin y Kumate a evaluar los cambios en valores de aminoácidos en el líquido amniótico. Los fundamentos teóricos descansan en la posibilidad de que los valores de a.a. en líquido amniótico no sólo sean representativos del estado fetal y que respondan a un diferente tipo de control. El estudio experimental se llevó a cabo en humanos con la aplicación de material radioactivo en la cavidad amniótica realizando posteriores mediciones en las diferentes estructuras tanto maternas como fetales. En sus resultados concluyen que es probable que el riñón fetal no sea el más importante factor de regulación en la dinámica de líquido amniótico ni en las concentraciones de sus constituyentes. De la misma forma tampoco la ingesta fetal es el único mecanismo relacionado a su disminución. Lo anterior plantea la posibilidad de que el líquido amniótico tenga sistemas de control independientes al ciclo orina/ingestión (70).

Cuando se ha comparado la vida media del material radioactivo en líquido amniótico en embarazos con trabajo de parto, ésta se encuentra mucho más reducida en ausencia de contracciones uterinas, lo cual puede llevar a la conclusión de que el feto aumenta su deglución con las contracciones, no se ha especificado si esto pudiera tener alguna relación con el aporte de energía del líquido amniótico

Los estudios con aplicación de aminoácidos marcados con material radiactivo en cavidad amniótica de fetos muertos han mostrado que las concentraciones plasmáticas maternas son 10 veces menores que en las madres con fetos vivos. Esto permite plantear la posibilidad de que aminoácidos fetales pasen a la circulación materna a través de los reflejos de deglución. Lo anterior vuelve a poner de manifiesto lo importante de la ingesta fetal y muy probablemente de las condiciones de líquido para la maduración del tubo digestivo (70).

En el estudio de Gitlin y Kumate se observa que el feto es capaz de ingerir el 50% del líquido amniótico producido diariamente, lo cual lleva a la necesidad de contar con otros medios para el intercambio del líquido amniótico y se hace notar la posibilidad de que la placenta puedan tener esta función.

Se postuló durante mucho tiempo que los a.a. en líquido amniótico eran aportados por la orina fetal, y eran una reflejo de los valores sanguíneos, esto no

fue más explorado. Esta idea fue reforzada a partir de la realización de amniocentesis tempranas en las que también se observó que las concentraciones de aminoácidos guardan las mismas proporciones que las sanguíneas. El riñón fetal inicia su aporte de aminoácidos al feto a partir de la semana 11 de gestación siendo más importante a partir de la semana 16. Sin embargo, es aquí cuando la concentración de aminoácidos disminuye. Se le ha atribuido a la orina fetal un efecto diluyente de solutos más que de concentración de ellos. En reportes en los cuales se han tomado muestras de aminogramas en la orina fetal se ha observado que la distribución de aminoácidos es totalmente diferente a la del líquido amniótico, lo cual vuelve a plantear la interrogante de su origen en el L.A.. Así mismo durante el curso de la gestación el riñón fetal incrementa su capacidad de reabsorción y los aminoácidos secretados al líquido amniótico son mucho menores que al inicio, si bien ambos fluidos nunca tienen la misma composición (16,52,68,71).

A pesar de los cambios en la cantidad total del líquido amniótico los esfuerzos por asociarlos con el retraso del crecimiento intrauterino han dado pocos resultados, llevando a la conclusión de que la evaluación en sangre fetal sea más adecuada para identificar la relación entre los datos clínicos del RCIU y las alteraciones de los a.a.. Esto último no ha sido concluyente y su aplicabilidad se ve disminuida por el mayor riesgo hacia el feto (16,69,72,73,74).

Es por lo tanto muy patente la alta consistencia de los aminogramas en líquido amniótico, algo que aún no ha podido ser explicado. Así mismo los cambios en sus niveles de a.a. comparados con los valores obtenidos en orina fetal establecen la pregunta si el líquido amniótico está constituido sólo de productos fetales.

Hormona del Crecimiento.

Diversas hormonas producidas por la madre, el feto y la placenta se interrelacionan para dar como resultado un adecuado funcionamiento de todos los sistemas metabólicos. Es poco probable definir jerárquicamente su funcionamiento; sin embargo, existen algunas que mantienen relación con los diferentes substratos y están muy relacionadas con el anabolismo proteico (13,46,47). Entre ellas se encuentra la hormona del crecimiento (hGH) la cual es producida en la adeno-hipofisis a través de las células acidófilas, las cuales han sido observadas desde las 9 semanas de gestación. Los gránulos característicos de secreción se hacen presentes desde la semana 12 y se incrementan de manera constante hasta el final del embarazo. En estudios de experimentación se ha encontrado capacidad secretora de hGH por la hipófisis fetal desde la semana 5, en la cual influyen tanto el cortisol, la hormona tiroidea y el factor de crecimiento parecido a la insulina 1 (IGF-1) con el cual mantiene una relación importante a lo largo de todo el embarazo (13,75,76).

En muestras sanguíneas fetales tomadas por cordocentesis se han encontrado valores de hGH desde los 70 días posteriores a la fecundación, con un incremento que va desde 50mg/mL a la semana 10 hasta 150 mg/mL a la mitad del embarazo, posteriormente disminuye rápidamente manteniendo siempre sus valores por arriba a los del adulto (43).

En el feto de la oveja se ha descrito una amplia variedad de pulsos de liberación de hGH con una vida media mayor que en el adulto, lo cual puede representar los valores aumentados en la etapa intrauterina. Ya en la etapa gestacional la liberación de hGH está regulada por dos agentes; el factor liberador hipotalámico (GRF) que estimula el crecimiento del somatotropo, la síntesis y secreción de hGH y por el factor inhibidor o somastostatina (SRIF); sin embargo, existen una gran cantidad de factores que influyen en el control de hGH tales como endorfinas, péptidos y aminoácidos como arginina y IGF-1.

Se ha postulado que el incremento en los niveles de hGH pueden ser debidos a una falta de receptores para SRIF, lo cual lleva a una constante estimulación y eliminación de hGH. A medida que el embarazo avanza, se incrementan los receptores a este factor inhibidor y por lo tanto disminuye la concentración de hGH.

El efecto de la hGH en la etapa intrauterina no se encuentra totalmente establecido, si bien en fetos con deficiencia idopática y en anencéfalos, la restricción del crecimiento no ha sido evidente, si existe una diferencia de aproximadamente 0.8 SD comparados con el crecimiento normal (77).

Parece ser que una de las funciones más claras es la regulación del metabolismo fetal, y juega un papel importante en la maduración pancreática, en estadios tempranos del embarazo una disminución en la concentración de glucosa es seguida de una baja en la concentración de hGH, lo cual altera la maduración pancreática y los acumulos de glucógeno en el hígado fetal. Así mismo, se ha observado un aumento en los niveles séricos de hGH de fetos a término con retraso en el crecimiento comparados con aquellos de crecimiento normal, este aumento parece paradójico debido a que la hGH parece influir directamente en el crecimiento después del sexto mes de vida (43). Este aumento parece corresponder a una disminución del factor de crecimiento insulinoide tipo 1, que si tiene una actividad directa sobre el crecimiento fetal y en el cual existe una relación inversa con hGH. Los niveles de hormona de crecimiento a lo largo de la gestación disminuye en fetos con crecimiento normal con una relación inversa a IGF-1, el cual aumenta al final, esta relación se invierte en fetos con retraso en el crecimiento (24,43,44,76). Hay muy pocos reportes acerca de hGH en liquido amniótico, en ellos se menciona que los niveles de hGH aumentan hasta la segunda mitad del embarazo y posteriormente disminuyen hasta el término con amplias variaciones individuales. Esto se ha postulado que es debido a que la secreción de hGH es controlada por el hipotálamo y que este aumento representa una falta de madurez en el control de esta hormona (43,44,75).

Se ha sugerido que el incremento en **IGF-1** puede inhibir la secreción de **hGH** , a su vez la secreción de **IGF-1** es modulada por la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno. También la insulina actúa estimulando la secreción de **IGF-1** y la disponibilidad de factores nutricios a través de la placenta

Existe una variante (**hGH-V**) producida por la placenta, la cual aumenta al final del embarazo y substituye a la **hGH** producida por la madre, al parecer la función de esta hormona es la estimulación de órganos maternos y mantener un aporte constante de nutrientes hacia la placenta. **hGH-V** no se encuentra en liquido amniótico ni en sangre fetal, a su vez no es controlada su secreción por el factor liberador de hormona del crecimiento (45,47,78).

Existe en la placenta humana un factor liberador de Hormona de Crecimiento (**GHRH**) que parecen jugar un papel importante en la regulación del Lactógeno Placentario (**LP**) y de la misma hormona del crecimiento (**hGH**) incrementando **IGF-1,2** a través de una retroalimentación negativa La función conjunta de la hormona del crecimiento y del lactógeno placentario mejora la capacidad de transporte de la glucosa y los aminoácidos a nivel placentario y aunque la hormona del crecimiento al parecer no está directamente relacionada con el crecimiento intrauterino si lo esta como factor de regulación de los factores parecidos a la insulina y al funcionamiento placentario (74,75).

Sin embargo, en muestras tomadas al final del embarazo se observa una diferencia clara en la producción de hormona del crecimiento en fetos con restricción en el crecimiento. Estos valores se encuentran aumentados hasta el segundo mes de vida extrauterina, lo cual lleva a la conclusión de que a pesar de la restricción en el crecimiento, el feto logró llegar al final del embarazo y adaptarse a la disminución en nutrientes manteniendo los valores de sus precursores metabólicos constantes (44).

La función de la hormona del crecimiento puede, por lo tanto, estar asociada, aún en útero, a los cambios en la disponibilidad de nutrientes, es probable que su función no sea el incrementar directamente el crecimiento de los tejidos pero si el movilizar y activar los procesos de transporte/producción de substratos en el feto.

Esto último ha sido señalado como una posible función de la **hGH-V**, la cual puede influir en la movilización de nutrientes maternos con una mayor disponibilidad para ser captados por la placenta y probablemente por las membranas. De la misma forma **hGH** fetal puede tener función en la movilización de nutrientes fetales y en la absorción a través de placenta y membranas, de esta manera se puede identificar como uno de los procesos de adaptación fetal a un estado de privación alimenticia (45,47).

II. Justificación.

El incremento en los recursos tecnológicos ha llevado a la generación de una mayor cantidad de conocimientos sobre el embarazo. El estudio de la fisiología fetal se ha incrementado a partir de la segunda década del presente siglo. Muchos esfuerzos se han hecho para buscar pruebas diagnósticas del estado fetal muchas de ellas sin un fundamento de los procesos metabólicos, esto ha generado que muchos conceptos cambien a lo largo del tiempo a la luz de las nuevas investigaciones.

El crecimiento fetal normal se ha considerado como una manifestación de salud intra-uterina, representa un adecuado aporte, distribución y utilización de nutrientes. Se le ha relacionado muy cercanamente con el adecuado desarrollo estructural, y es considerado uno de los datos más confiables de bienestar fetal. El retraso en el crecimiento intra-uterino (RCIU) es la complicación más frecuente encontrada en el embarazo. Sus implicaciones clínicas incluyen una mayor posibilidad de muerte en útero, de hipoxia al nacimiento y de una disminución en la capacidad de adaptación del feto a situaciones fisiológicas. Al nacimiento se asocia a una mayor incidencia de enfermedades respiratorias, a lesiones intestinales y hemorragia intraventricular, durante la etapa post-natal, existe un mayor riesgo de lesiones neurológicas y una disminución del desarrollo psicomotor, de una menor estatura, y en la edad adulta a lesiones cardiovasculares y el desarrollo de diabetes.

Sus complicaciones son muchas y muy variadas y dependen del grado de retraso en el crecimiento que el feto presente y de la forma en que se vigile al feto y se presente el nacimiento.

Las manifestaciones clínicas de RCIU incluyen una disminución del tejido graso, falta de desarrollo muscular, disminución crónica de oxígeno, debido a la cual un fenómeno de redistribución vascular aumenta con el flujo sanguíneo a los órganos más importantes (cerebro, corazón, riñón, suprarrenales) y disminuye el aporte al tejido óseo, muscular y graso.

Sin embargo las manifestaciones del RCIU son debidas también a una alteración en la disponibilidad/movilización de nutrientes. Esto puede estar presente desde el inicio del embarazo y dar como resultado una inadecuada formación de tejidos, lo anterior llevará a una mala maduración y por lo tanto una función disminuida.

Con el presente estudio nos planteamos el conocer el comportamiento de aminoácidos en líquido amniótico en diferentes edades gestacionales, sus relaciones en los diversos grupos de características bioquímicas similares y en su capacidad de ingresar a los ciclos de energía y en la producción de glucosa, así mismo nos interesa el relacionarlos con los cambios en los aminoácidos

maternos, buscar sus relaciones y/o diferencias y por último evaluar a la hormona del crecimiento en líquidos amnióticos de fetos con crecimiento normal y anormal y sus relaciones con los aminoácidos.

Lo anterior basados en la posibilidad de que el líquido amniótico tenga sus propios mecanismos de control y que responda de una forma activa a las diferentes necesidades fetales. Dichos mecanismos de control se pueden expresar a través del control de sus nutrientes por medio de las hormonas. Consideramos que su función va más allá de sólo ser un protector pasivo del estado fetal y un reflejo de la función renal. Dado el tiempo y las diferentes etapas en las que está en contacto con el feto, su función puede ser también el de aportar nutrientes, y estimular la maduración orgánica. Es necesario investigar en su fisiología para poder de esta manera entender mejor su función.

III. METODOLOGIA

Planteamiento del problema.

El plasma materno es la principal fuente de aminoácidos para el feto, el adecuado desarrollo depende de su aporte, aún en embarazos que cursen con retraso en el crecimiento dicho aporte no debe variar. En caso de que la proporción y valores de los aminoácidos cambiara es poco probable que el embarazo continúe. Sin embargo, a pesar de que se mantenga una adecuada proporción en los a.a., éstos pueden provenir de las reservas proteicas de la madre, si esto lleva a una mala calidad en la formación de estructuras de intercambio entre la madre y el feto no es aún conocido. De tal forma que es poco probable que los aminoácidos en plasma presenten cambios a lo largo del embarazo y tampoco es probable que se modifiquen en caso de un retraso en el crecimiento.

Si la madre es la encargada de suministrar nutrientes al embrión, éstos deben ser captados por las membranas, transportados a los líquidos extracelómicos y amnióticos y de ahí ser transferidos al feto. Aún a pesar de que al avanzar el embarazo la placenta toma el control de dichos mecanismos de transporte, es probable que las membranas mantengan su transporte de nutrientes hacia el líquido amniótico, de tal forma que es probable que los aminogramas en líquido amniótico tengan una alta relación con los aminogramas maternos. De la misma forma así como la placenta aumenta su transporte en caso de retraso en el crecimiento intrauterino, es probable que las membranas lo hagan también.

Las altas concentraciones de hormonas en líquidos amnióticos de fetos con retraso en el crecimiento pueden influir en ese transporte de nutrientes, de tal manera que hormona del crecimiento fetal puede estar al menos relacionada con los valores de los aminoácidos.

De tal forma que el evaluar el comportamiento de a.a. en líquido amniótico, sus relaciones con los maternos, sus cambios en caso de presentarse un retraso en el crecimiento intrauterino y sus relaciones con hormona del crecimiento pueden aportar una mayor información acerca de los procesos de intercambio y adaptación fetal.

Preguntas a investigar.

1.- ¿Cuáles son los valores totales de aminoácidos libres y cómo se comportan los diferentes perfiles de a.a. medidos en el líquido amniótico y en plasma materno en diferentes edades gestacionales?

- 2.- ¿Son diferentes los valores de los a.a. determinados en líquido amniótico y en plasma materno en diferentes sujetos en la misma edad gestacional?
- 3.- ¿Existe alguna diferencia en los valores individuales y en los perfiles de aminoácidos en líquido amniótico y plasma materno en embarazos que cursan con un feto con retraso en el crecimiento intrauterino?
- 4.- ¿Existe alguna correlación entre los perfiles de a.a. en líquido amniótico y en plasma materno?
- 5.- ¿Cuáles son los valores de hormona del crecimiento en líquido amniótico en la primera y segunda mitad del embarazo con crecimiento fetal normal?
- 6.- ¿Se modifican los valores de hormona del crecimiento en el líquido amniótico cuando se instala un retraso en el crecimiento intrauterino?
- 7.- ¿Cuál es la relación entre los valores de hormona de crecimiento y los aminoácidos en líquido amniótico?

Hipótesis.

- 1.- Los perfiles de a.a. determinados en plasma materno y en líquido amniótico en embarazos con fetos con crecimiento normal y con un periodo de ayuno materno similar presentarán valores muy homogéneos cuando son determinados en la misma edad gestacional. Dichos valores totales se pueden modificar a lo largo del embarazo pero las relaciones entre los diferentes a.a. se mantendrán iguales.
- 2.- Los perfiles de a.a. serán diferentes en los embarazos que presenten retraso en el crecimiento fetal cuando son comparadas con embarazos con fetos con crecimiento normal en la misma edad gestacional.
- 3.- Existirá una correlación al menos de .7 entre los perfiles de a.a. en líquido amniótico y las obtenidas en sangre periférica materna obtenidas en la misma edad gestacional.
- 4.- Existirá una concordancia de más del 70% en el comportamiento entre los perfiles de a.a. determinados en líquido amniótico en fetos con crecimiento normal y que se encuentren en la misma edad gestacional.
- 5.- La concentración de hormona del crecimiento en líquido amniótico, será diferente en fetos con retraso en el crecimiento intrauterino cuando sus valores son comparados a los valores obtenidos en fetos con crecimiento normal y en la misma edad gestacional.

6.- Existirá una relación significativa entre los valores de hormona del crecimiento y los aminoácidos de cadena ramificada.

Objetivos.

- 1.- Medir la concentración de aminoácidos libres en líquido amniótico y en plasma materno en diferentes edades gestacionales.
- 2.- Cuantificar la diferencia entre los valores a diferentes edades gestacionales.
- 3.- Establecer las diferencias en caso de que éstas se presenten en los valores de fetos con crecimiento anormal.
- 4.- Describir cómo se comportan los perfiles de a.a. en tres diferentes edades gestacionales en embarazos con crecimiento fetal normal y cómo se modifican en casos de retraso en el crecimiento intrauterino.
- 5.- Identificar la relación de los valores de dichas variables medidas en líquido amniótico con las obtenidas en sangre periférica materna y obtenidos a la misma edad gestacional.
- 7.- Identificar la concordancia de las mediciones de a.a. en líquido amniótico en diferentes sujetos en la misma edad gestacional.
- 8.- Cuantificar la diferencia entre los valores de hormona del crecimiento en líquido amniótico en fetos con retraso en el crecimiento comparados con fetos con crecimiento normal evaluados en la misma edad gestacional.
- 9.- Establecer la asociación entre hormona del crecimiento y los aminoácidos en líquido amniótico en diferentes edades gestacionales, en fetos con crecimiento fetal normal y anormal.

Diseño del Estudio.

Estudio transversal y comparativo.

Universo.

Pacientes embarazadas que acudieron al Departamento de Medicina Fetal del Instituto Nacional de Perinatología, candidatas a amniocentesis para determinación de cariotipo en líquido amniótico, o para determinación de madurez pulmonar en las siguientes semanas de gestación 16-18, 26-28, 33-35.

Lugar de estudio.

En el Departamento de Medicina Fetal del Instituto Nacional de Perinatología se llevó a cabo la captación de pacientes, las mediciones ultrasonográficas y la toma de muestra tanto de líquido amniótico como de sangre materna.

En la Facultad de Bioquímica de la Universidad Nacional Autónoma de México se realizó la medición de los aminoácidos.

En el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Perinatología se realizaron las mediciones hormonales.

En el Departamento de Fisiología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología se analizaron los resultados.

Cálculo del tamaño de muestra.

Se estableció el tamaño de muestra en base a un análisis hecho por los autores de este trabajo a los diferentes trabajos de publicación, en los cuales se encontró una relación entre los diferentes aminoácidos de más del 70%, dicha relación no está acotada en los trabajos originales.

Con un r de .70, con un alfa de 0.05 y con un valor de beta de 0.10 se obtiene un aproximado de 14 pares de muestras.

Se evaluaron 19 en total.

No se encontraron datos en la literatura para establecer el cálculo del tamaño de muestra en hormona del crecimiento en líquido amniótico, de tal forma que se utilizaron como supuestos una diferencia del 0.75 en la comparación entre ambos grupos, un alfa de 0.05 y un valor de beta de 0.20, lo cual da como resultado un total de 20 casos por grupo.

En total se evaluaron 60 casos.

Se espera así mismo, una correlación entre hormona del crecimiento y aminoácidos de cadena ramificada de .75.

El cálculo se basa en el Apéndice 13-A para establecer el tamaño de muestra para utilizar la prueba de T y en el Apéndice 13-C para establecer el tamaño de muestra para una correlación en el libro de Diseño de la Investigación Clínica de Stephen Hulley. (83)

Selección de la población.

Criterios de inclusión.

- 1.- Pacientes con embarazo único y vitalidad comprobada.
- 2.- Con una edad gestacional segura calculada por fecha de última menstruación con periodos menstruales rítmicos y confiables o a través de un estudio de ultrasonido antes de la semana 12 de embarazo.
- 3.- Candidatas a toma de muestra de líquido amniótico para estudio citogenético o de madurez pulmonar.
- 4.- Con peso adecuado para su edad, talla y edad gestacional de acuerdo a las tablas de Arroyo. (79)
- 5.- Sin enfermedad sistémica materna (hipertensión, enfermedades de la colágena, diabétes)
- 6.- Sin enfermedades instauradas durante la gestación (Enfermedad Hipertensiva Asociada al Embarazo, diabetes gestacional).
- 7.- Que acepten participar en el estudio previa explicación del proceso.

Criterios de exclusión.

- 1.- Datos ultrasonográficos sugestivos de cromosomopatía y/o alteración estructural fetal.
- 2.- Con índice de líquido amniótico menor a 5 ó mayor a 18 cm medido en la técnica de cuatro cuadrantes. (80)
- 3.- Presencia de meconio o sangre en la toma de la muestra.

Criterios de eliminación

- 1.- Estudio citogenético que determine alteración cromosómica.
- 2.- Alteraciones estructurales diagnosticadas al nacimiento.
- 3.- Que al nacimiento el peso del recién nacido lo excluya del grupo al cual se le asignó durante la evaluación .
- 3- Datos incompletos o no valorables.

Variables.

<u>Independientes:</u>	Edad Gestacional Crecimiento fetal normal Retraso en el crecimiento intrauterino.
<u>Dependientes:</u>	Concentraciones totales y perfiles de aminoácidos Hormona del Crecimiento

IV. MATERIALES Y METODOS

Definición operacional de las variables y escalas de medición.

Independiente.

Edad Gestacional.- Se considera al tiempo aproximado que el feto ha permanecido en el útero después de la fecundación, se establece en semanas completadas y se calcula por medio de la regla de Naegele en la cual se toma como base el primer día del último periodo menstrual, se suman 7 días y este se considera el primer día del embarazo, posteriormente se suman los días transcurridos desde entonces, se calculan las semanas y se tiene la edad gestacional.

Variable de Intervalo. }

Con escalas de medición en semanas completas

Crecimiento Fetal Normal.- Evolución clínica y ultrasonográfica del tamaño y peso del feto. Las medidas ultrasonográficas deberán encontrarse dentro de dos desviaciones estandar de la curva de crecimiento esperada.

Se midieron los siguientes segmentos fetales:

Diámetro Biparietal.- En un corte axial medio del cráneo fetal, observando claramente el contorno óseo, identificando los tálamos, el septum pellucidum y el cavum del septum pellucidum, así como las prolongaciones temporales de los ventriculos laterales. Se midió perpendicularmente al eje craneal, pasando por el medio de los tálamos, colocando el cursor de la tabla externa del hueso parietal proximal al transductor y el segundo cursor en la tabla interna del hueso parietal distal. La medición se realizó en centímetros y se calculó con las tablas estandarizadas de Hadlock. Se realizaron tres mediciones y la media se tomó como el resultado final.

Circunferencia Cefalica.- En el mismo plano anatómico ya descrito, se realizó la medición tomando en cuenta el contorno externo de los huesos del cráneo, el equipo cuenta con posibilidad de medición de áreas y perímetros circulares y hace el análisis automáticamente. Los resultados se obtuvieron en centímetros y se calculó con las tablas estandarizadas de Hadlock (81). De la misma forma se realizaron tres mediciones y la media se tomó como la representativa.

Circunferencia Abdominal.- En un corte anatómico axial en el abdomen fetal, observando la columna vertebral, la cámara gástrica y el seno portal. Se evaluó la circunferencia externa, tomando en cuenta la piel fetal, esto permite hacer una estimación subjetiva de la acumulación de grasa y por lo tanto la posibilidad de

desnutrición en útero. Se midió en centímetros y se calculó con las tablas de Hadlock, se tomaron tres mediciones y la media fue la representativa.

Longitud de fémur.- En un corte sagital midiendo la diáfisis femoral delimitada por los dos cartilagos de crecimiento y sin tomar en cuenta las epifisis. Se realizaron tres mediciones y la media se tomó como el valor representativo, se calculó en centímetros y se evaluó con las tablas de Hadlock.

La representación gráfica de las gráficas mencionadas delimita el área comprendida en más, menos, dos desviaciones estándar, si los valores obtenidos por la media de todas las mediciones se encuentran dentro del grupo (+/-2ds) se consideró como no retraso en el crecimiento intrauterino. Si los valores obtenidos por las medias de todas las mediciones se encontraron por debajo de dos desviaciones estándar se realizó el diagnóstico de retraso en el crecimiento intrauterino.

Las curvas mencionadas han sido utilizadas en muchos países del mundo y concuerdan con los datos de crecimiento normal. No existe hasta el momento tablas en población mexicana para valorar el crecimiento intrauterino.

Variable categórica dicotómica.

Retraso en el Crecimiento Intrauterino. Disminución en el incremento de peso y tamaño del feto en relación a lo esperado para su edad gestacional. El diagnóstico se establece cuando la edad calculada por ultrasonografía valorada por los mismos parámetros antes descritos es menor a dos desviaciones estándar de la esperada para esa edad gestacional. (23,24)

Variable categórica dicotómica.

Las mediciones se realizaron en un equipo de ultrasonido ATL (Advanced Technology Laboratory, Seattle Washington USA) Ultramark-9 HDI con un transductor convexo de 3.5 MHz.

La evaluación se realizó por dos médicos perinatólogos, en la cual la variabilidad interobservador e intraobservador se cálculo en menos de 0.3 y una concordancia de 0.7.

Dependientes

Aminoácidos.- Unidades formadoras de proteínas que consisten en un grupo amino, grupo carboxilo y una cadena lateral.

Consideraremos para el análisis de perfiles de aminoácidos a su diferenciación entre esenciales y no esenciales, a los grupos de acuerdo a sus características químicas y a los grupos de ingreso al ciclo del ácido cítrico en la generación de energía. (ver la sección de antecedentes para la clasificación)

Metodología de análisis de alfa-aminoácidos.

1.- Extracción

Extracción de aminoácidos mediante ácido pícrico. (Alejandre 1981, Lucas 1988)

Para realizar esta extracción se precipitan las proteínas plasmáticas y el extracto resultante se lleva a un volumen conocido.

Muestra.- El plasma y el líquido amniótico se reciben congelados en tubos de ensayo tapados y se mantienen así a menos 20 grados hasta su extracción.

Material.- Columna de Vidrio 37.7 cm x 1 cm con fondo de vidrio poroso.
Centrifuga Dynac (Clay Adams).
Tubos de Centrifuga de vidrio 15 ml Pyrex.

Reactivos.- Ácido Clorhídrico 0.02 N (J.T. Baker).
Ácido Pírico 1% en agua (Baker).
Resina de intercambio aniónico Dowex Ag 2-X8 malla 200-400 (Bio Rad Lab).

Procedimiento:

- 1.- Se descongela la muestra a 30 grados y se homogeneiza perfectamente.
- 2.- Se lleva 1 ml de muestra en un tubo de centrifuga y se adiciona ácido pícrico al 1%, 2 ml para plasma, 1 ml. para el líquido amniótico.
- 3.- Centrifugar a 4000 r.p.m. por 30 minutos.
- 4.- El sobrenadante se pasa por una columna de vidrio que contiene 1 cm de altura de resina de intercambio aniónico (0.5 g) para eliminar ácido pícrico.
- 5.- Lavar 4 veces el tubo de centrifuga y 10 veces la columna con 0.5 ml de HCL 0.02 N, a fin de no perder aminoácidos.
- 6.- Se recibe líquido translúcido resultante en un matraz aforado de 10 ml y se afora con HCL 0.02 N. Este líquido constituye el extracto.
- 7.- Congelar en un vial limpio y seco a menos 30 grados centígrados hasta su análisis.

2.-Determinación de Aminoácidos Totales

Mediante método colorimétrico con ninhidrina (Lee, 1966).

Material. Espectrofotómetro UV-Visible GBC Modelo 115 de un solo Haz.

Reactivos.-

Aminoácido patrón L-Alanina (Sigma Chemical Company)

Ácido Clorhídrico 0.02 N (JT Baker).

Solución de Ninhidrina al 10% (Sigma Chemical Company).

Procedimiento.

- 1.- Se prepara un estándar de alanina de 0.5 $\mu\text{mol/ml}$.
- 2.- Se preparan tubos de ensayo con concentraciones de alanina de 0.05 $\mu\text{mol/ml}$. a 0.2 $\mu\text{mol/ml}$., diluidas con HCL 0.02 N, para el caso de la curva patrón; para el caso de las muestras se ensayan 0.8 ml del extracto directo. El volumen final de reacción es de 2 ml.
- 3.- Se adiciona 0.5 ml de solución de ninhidrina.
- 4.- Se colocan los tubos en un baño de agua en ebullición por 12 minutos.
- 5.- Se enfrían los tubos de agua corriente y se procede a leer la absorbancia a 570 nm. con un blanco de HCL 0.02 N dentro de un espacio de tiempo no mayor a una hora.
- 6.- Se repite 3 veces la curva patrón y las muestras se ensayan por duplicado.

Variable Numérica Continua.

Con unidades de medición en Micromoles/100 ml. de muestra.

3.- Obtención de los Aminogramas.

Por el método de autoanalizador.

Preparación de las muestras.

Los extractos de aminoácidos provenientes del plasma sanguíneo y líquido amniótico se descongelan y se mantienen a temperatura ambiente hasta la toma de su alicuota.

Material: Liofilizadora 4.5 Ab. Gonco modelo 77500-00.

Reactivos: Hielo seco, Acetona.

Procedimiento:

- 1.- Se descongela la muestra a 30 grados centígrados y se homogeneiza perfectamente.
- 2.- Se toma una alicuota y se lleva a un vial pequeño.
- 3.- Se congela en un baño de hielo seco-acetona.
- 4.- Se procede a liofilizar hasta la sequedad de la muestra con el fin de concentrarla. Se obtiene este punto cuando en las paredes del tubo o vial se observa polvo fino y no hay restos de hielo.
- 5.- El vial con la muestra se cierra con parafina y se conserva en refrigeración hasta la obtención del cromatograma.

Cromatografía

Este método consiste en el uso de una columna, 3 buffers de elución, un buffer de regeneración y un reactivo de ninhidrina.

Material:

Autoanalizador de aminoácidos de alta presión sistema Beckman modelo 6300.
Adaptador para filtración en jeringa Millipore XX30-012-00 (Millipore Corporation Bedford)
Membrana Millipore tipo HA (Tamaño de poro 0.22 micrómetros).
Columna empacada de resina de intercambio catiónico de sodio (NA+) de 4mm x 12 cm. Beckman.
Sonicador Cleaner Metler Electronics modelo ME.

Reactivos:

Buffer de dilución de muestra pH = 2.0 Beckman.
Buffer de elución pH = 3.0 Beckman System 6300.
Buffer de elución pH = 4.3 Beckman System 6300.
Buffer de elución pH = 6.3 Beckman System 6300

Estándar de aminoácidos adicionado con urea, citrulina y ornitina, obtenidos de Sigma Chemical Co.

Procedimiento:

- 1.- Se prepara un estándar de aminoácidos a una concentración de 100 nmol/ml.
- 2.- Se inyectan 50 microlitros de este estándar en el autoanalizador mínimo 6 veces y se determina la reproducibilidad de los cromatogramas obtenidos.
- 3.- Se preparan para su inyección las muestras almacenadas
- 4.- La muestra ya liofilizada se reconstituye a un volumen conocido con el Buffer de dilución.
- 5.- Se pasa esta muestra lentamente a través de la membrana de filtración y se recibe en un vial limpio.
- 6.- Se sonica el filtrado por 15 minutos con el fin de eliminar gases disueltos que pudieran interferir en la cromatografía.

7.- Transcurrido este tiempo la muestra se encuentra lista para inyectarse.

8.- Se inyectan 50 microlitros de la muestra en el autoanalizador.

Como resultado de la evaluación de la reproducibilidad del autoanalizador de alta presión sistema Beckman 6300 se obtuvo:

- En cuanto a la precisión en los tiempos de retención obtenidos, el máximo coeficiente de variación fue para ácido aspártico:

$$ds = 0.1130 \quad \text{promedio} = 8.9783 \quad N=6 \quad CV = 1.26\%$$

- En cuanto a la precisión en las áreas de los picos obtenidos, el máximo coeficiente de variación fue para ácido glutámico:

$$ds = 6.3189 \quad \text{promedio} = 328.0950 \quad N=6 \quad CV = 1.92\%$$

-La precisión de los tiempos de detección y de las áreas obtenidas por el autoanalizador Beckman cumple con el criterio aceptable para los métodos cromatográficos es CV ($\leq 2\%$) definido como

$$CV = DE/\text{media} \times 100.$$

Condiciones del equipo para la separación de Aminoácidos.

	Altura de la Columna	12 cm.
	Temperatura de la Columna	53 (°C) 11 minutos 75 (°C) 23 minutos 77 (°C) 31 minutos
	Temperatura del Reactor (°C)	135
	Flujo de Reactivos ml/hr	21
	Presión (psig)	1300
Para aminoácidos ácidos y regeneración.	Buffer Na-F Agua 96.6%, citrato de sodio 1.7%. Ácido clorhídrico 0.7%, pH 3.0	23.8 minutos
Para aminoácidos neutros	Buffer N a-F Agua 98%, citrato de Sodio 1.7%, ácido clorhídrico 0.3% pH 4.3	12.2 minutos
Solución lavadora	Na-R agua 99.2% NaOH 0.8% pH 13.0	2 minutos
Regeneración	Buffer Na-E pH 3.0	18 minutos.

Tiempo total de corrida 65 minutos, más 20 minutos para regeneración.

Composición del Estándar de Aminoácidos.

<i>Aminoácido</i>	<i>nmol/ml</i>
l-alanina	100
l-arginina	100
l-ácido aspártico	100
l-cistina	50
l-ácido glutámico	100
l-glicina	100
l-histidina	100
l-isoleucina	100
l-leucina	100
l-lisina	100
l-metionina	100
l-fenilalanina	100
l-prolina	100
l-serina	100
l-treonina	100
l-triptofano	100
l-tirosina	100
l-valina	100
l-citrulina	100
l-ornitina	75
Urea	1500
cloruro de amonio	100

Variable Numérica Continua.

Con unidades de medición en Micromolas/100 ml.

22

CONGELAR

Mediciones Hormonales

Hormona Del Crecimiento. Hormona proteica producida por la adeno-hipófisis que durante el periodo prenatal presenta altas concentraciones en sangre fetal, su función en esta etapa no ha sido totalmente identificada, al parecer juega un papel importante en la secreción de factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF) y en la maduración pancreática estimulando la expresión del gen de la insulina y la diferenciación de los islotes beta del páncreas. Así mismo puede actuar en la movilización de los diferentes precursores metabólicos hacia el feto.

Técnica de medición por radioinmunoanálisis. Variable continua con una escala de medición en nanogramos por mililitro (ng/ml). La medición se realizó con un contador Gama LKB Wallace 1275.

Se utilizó Kitt de doble anticuerpo (0-30 ng/ml) de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles California) Los resultados se expresan en

nanogramos por mililitro en referencia al estándar internacional (NIAMDD-hGH-RPI).

Sensibilidad de 1.0 ng/ml.

Precisión Para concentraciones ≤ 5.0 ng/ml, la variación intraensayo fue $\leq 5.9\%$ y la variación interensayo fue $\leq 8.3\%$ para concentraciones ≥ 5.0 ng/ml y ≤ 30.0 ng/ml, la variación intraensayo fue $\leq 1.6\%$ y la variación interensayo $\leq 3.4\%$.

Especificidad.- El anticuerpo empleado tiene una reactividad cruzada con prolactina $\leq 0.6\%$ y $\leq 0.006\%$ con lactógeno placentario, TSH, LH, FSH y la subunidad beta de hGC.

El 50% en la transformación Log-Logit osciló entre 6.6 y 7.5 ng/ml.

Variáble numérica continua.

Con unidades de medición en nanogramos/ml

Descripción General del Estudio

El día de la selección

Las pacientes fueron seleccionadas de acuerdo a los criterios antes mencionados en el Departamento de Medicina Fetal del Instituto Nacional de Perinatología. Se les ofreció información acerca de los fines del estudio y se obtuvo el consentimiento escrito de las pacientes.

Se registraron los datos completos y se realizó la siguiente valoración:
Identificación de signos clínicos, toma y registro de peso, talla, tensión arterial, temperatura corporal y frecuencia cardíaca.

Medición clínica del fondo uterino, identificación de partes fetales y registro de frecuencia cardíaca fetal.

Evaluación nutricional según las tablas de referencia de Arroyo.

Se citaron para la realización de amniocentesis dos días después, pidiéndoles que tomaran alimento a las 21 horas del día anterior al procedimiento y posteriormente acudir en ayuno.

El día del procedimiento:

Toma y registro de signos vitales maternos (tensión arterial, frecuencia cardíaca y respiratoria, temperatura).

En embarazos menores de 20 semanas, se palpó manualmente el útero y se registró el tamaño del fondo uterino. En embarazos con edades gestacionales mayores, la toma de un registro cardiotocográfico se realizó para eliminar la posibilidad de contracciones durante el estudio.

Ultrasonografía:

Evaluación anatómica completa y sistemática realizando la identificación de la inserción placentaria, de sus características, de la acumulación mayor de líquido amniótico

Cálculo de edad gestacional como ya se explicó.

Las pacientes fueron divididas en tres grupos diferentes para su análisis:

Grupo 1 Embarazos entre 16-18 semanas de gestación.

Grupo 2 Embarazos entre 26-28 semanas de gestación.

Grupo 3 Embarazos entre 33-35 semanas de gestación.

A su vez para cada mujer con embarazo de 28-30 semanas y de 33-35 semanas de gestación se identificó a una mujer con características clínicas similares, tanto, edad, número de embarazos, edad gestacional, ausencia de enfermedades sistémicas y con un feto con retraso en el crecimiento intrauterino, con un índice de líquido amniótico mayor de 5 centímetros.

Para el análisis de hormona del crecimiento se identificaron tres grupos:

Grupo 1 Menor a la semana 20 de gestación.

Grupo 2 Fetos con más de 28 semanas y con crecimiento fetal normal.

Grupo 3 Fetos con más de 28 semanas y con retraso en el crecimiento intrauterino

Amniocentesis.

Se realiza rastreo ultrasonográfico completo con un equipo ATL (advanced technology laboratories) HDI-9 (High definition image) con un transductor convexo de 3.5 Mhz. Se identifica la acumulación mayor de líquido amniótico tratando de evitar la placenta y al feto.

Se realiza asepsia y antisepsia de la región abdominal seleccionada con Mercurio Cromo, colocación de campos estériles.

Se protege el transductor ultrasonográfico con un guante y campos estériles. El cirujano y el ultrasonografista también con equipo de ropa quirúrgica estéril.

Utilizando solución fisiológica estéril para la conducción de las ondas sonoras a través de la piel, y bajo guía ultrasonográfica continua se realiza punción transabdominal y trans-uterina con una aguja de raquia calibre # 22, durante el procedimiento nunca se pierde de vista la punta de la aguja. En el momento de encontrarse la aguja en la máxima acumulación de líquido amniótico se extrae 1 ml para eliminar la posibilidad de contaminación con células maternas en la aguja, se toman 5 ml para las mediciones de aminoácidos y de hormonas y posteriormente 14 ml para el estudio citogenético o para la determinación de maduración pulmonar.

La literatura menciona que se pueden extraer hasta 30 ml de líquido amniótico en una punción a partir de la semana 16 para estudios moleculares, en nuestro caso nunca se tomaron más de 20 c.c. para el estudio citogenético, de maduración pulmonar y para nuestras determinaciones.

La aguja es retirada cuidadosamente y se realiza otra evaluación ultrasonográfica al terminar el procedimiento.

Se mantiene en reposo a la paciente por 30 minutos después del procedimiento y en los embarazos con edades gestacionales mayores de 20 semanas, se realiza un registro cardiotocográfico para identificar e inhibir en caso de ser necesario la presencia de contracciones uterinas.

La amniocentesis es el procedimiento invasivo de diagnóstico fetal más utilizado en la actualidad, el riesgo inherente del procedimiento se justifica bajo la base de que establecer la certeza diagnóstica permite modificar las estrategias de cuidado prenatal y de la atención al nacimiento.

El riesgo reportado en la literatura es de 0.5% de pérdida fetal, este se incrementa con el número de punciones y cuando la cantidad extraída de líquido sobrepasa los 30 c.c. Dicho riesgo varía mucho de hospital en hospital y depende mucho de la experiencia obtenida y de los recursos tecnológicos con los cuales se cuenta. (67)

En el Departamento de Medicina Fetal del Instituto Nacional de Perinatología se tiene una casuística de pérdida fetal por procedimiento de 0.7% y una probabilidad de repetir la punción de 1 en 200 procedimientos.

Inmediatamente después de la amniocentesis, se tomó sangre periférica venosa de la región cubital derecha. Se extrajeron 5 c.c. de sangre y se colocaron en tubos de cristal conteniendo 0.1 ml de heparina.

La manipulación de las muestras, a través de la jeringuillas, en su vaciamiento a los tubos de cristal y el cerrarlas herméticamente se realizó siempre con guantes estériles evitando así la contaminación de dichas muestras.

Las muestras se identificaron con su número de registro, nombre de la paciente y fecha de la toma.

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 3000 revoluciones por minuto durante 10 minutos en ambiente frío. Se colectó el plasma y se eliminaron los elementos formes sanguíneos.

Las muestras fueron transportadas en condiciones de temperatura de menos 4 grados centígrados y posteriormente almacenadas a menos 30 grados hasta el momento del análisis

Recolección y análisis de la información.

Los datos se colectaron en una Base de datos Excel-5 de Microsoft Office.

Las diferencias entre los valores de las medias de cada a.a. o de los grupos de edad gestacional se realizaron con la Prueba de T.

Para diferencias entre los diferentes perfiles de aminoácidos se utilizó Ji cuadrada, y la prueba de Wilcoxon Mann Withney. Para asociaciones entre las mediciones maternas y las obtenidas en líquido amniótico se utilizó el coeficiente C de Kramer y la Coeficiente de correlación R de Pearson.

Para las diferencias de Hormona del crecimiento prueba de T para comparar dos medias de grupos independientes. (82)

Las medidas de asociación entre hormona del crecimiento y los aminoácidos fueron el coeficiente de regresión r de Person y el cálculo de regresión lineal múltiple.

Paquete computacional SPSS.

Requisitos Eticos

La toma de muestra de líquido amniótico se indicó ya sea, por la necesidad de establecer el bienestar fetal por razones genéticas, o determinar madurez pulmonar para la interrupción del embarazo. Estas indicaciones son aceptadas por el comité de bioética de la Institución y sólo se incrementó en la misma punción la toma de 5 c.c. extras de líquido para nuestro análisis.

A la paciente se le informó detalladamente el motivo del estudio, de los riesgos del procedimiento y de los beneficios obtenidos ofreciéndole información en el momento en que ella así lo requiriera.

Se le ofreció una carta con la información acerca del estudio, los propósitos y los riesgos potenciales, aún en caso de firmarla y aceptarla se le volvió a preguntar el día del procedimiento, si ella decidió no participar en el estudio se le excluyó del mismo.

V. RESULTADOS

Se evaluaron muestras de líquido amniótico y de plasma materno correspondientes a 19 mujeres divididas en 3 grupos; 6 en las semanas 16-18 de gestación, todas con crecimiento fetal acorde a la amenorrea, 7 en las semanas 26-28, 4 con crecimiento fetal normal y 3 con retraso en el crecimiento y 6 en la semana 33-35 de la gestación, 3 con crecimiento fetal normal y 3 con retraso en el crecimiento intrauterino.

Cada grupo se identifica con el límite superior de las semanas de gestación al cual corresponde.

Para las determinación de Hormona del Crecimiento (HG) se evaluaron 60 líquidos amnióticos.

En la tabla anexa se presenta la estadística descriptiva de las determinaciones de aminoácidos y hormona del crecimiento.

En todos los aminogramas se analizaron un total de 19 aminoácidos.

Tabla 1.-Nombre y número correspondiente a cada aminoácido

Nombre	#	Nombre	#
Ácido Aspártico	1	Histidina	11
Ácido Glutámico	2	Treonina	12
Citrulina	3	Serina	13
Alanina	4	Glicina	14
Ornitina	5	Valina	15
Arginina	6	Isoleucina	16
Cisteína	7	Leucina	17
Metionina	8	Lisina	18
Tirosina	9	Prolina	19
Fenilalanina	10		

En el anexo 1 se presentan los datos obtenidos en cada mujer embarazada, sus valores en líquido amniótico y en plasma. El número de identificación corresponde a los registros internos al momento de captar la muestra. Se registra edad gestacional y se anexa la letra r para especificar los casos con retraso en el crecimiento intrauterino.

Aminoácidos Totales.

Los aminoácidos totales en líquido amniótico muestran una tendencia a disminuir, conforme avanza el embarazo. Su concentración en la semana 18 es mayor que la encontrada en la semana 35. En plasma materno se observa una ligera tendencia al aumento hacia el final del embarazo.

Tabla Anexa 1: Determinaciones de Aminoácidos

Aminoácido (Media \pm D.E.)	Semanas 16-18	Semanas 19-28	Semanas 29-35
Alanina	35.46 \pm 11.41	21.62 \pm 6.79	12.84 \pm 8.62
Arginina	3.80 \pm 1.38	3.55 \pm 2.66	1.12 \pm .483
Aspartato	2.79 \pm 2.32	2.11 \pm .80	2.43 \pm 1.36
Cisteina	3.40 \pm 1.42	4.23 \pm 1.41	3.14 \pm 1.04
Citrulina	3.21 \pm .811	6.20 \pm 4.20	2.75 \pm 1.36
Fenilalanina	6.87 \pm 3.017	4.33 \pm 1.91	2.29 \pm .904
Glicina	13.99 \pm 4.70	17.19 \pm 2.97	11.02 \pm 2.53
Glutamina	22.65 \pm 5.58	23.20 \pm 6.90	2.64 \pm 6.70
Histidina	7.91 \pm 2.28	5.44 \pm 3.16	3.44 \pm 1.57
Isoleucina	3.41 \pm 1.03	1.73 \pm .60	1.09 \pm .4892
Leucina	7.88 \pm 3.87	3.81 \pm 1.47	1.95 \pm .3260
Lisina	22.87 \pm 6.00	16.44 \pm 4.99	8.42 \pm 2.03
Metionina	2.50 \pm 1.17	2.11 \pm .44	1.36 \pm .717
Ornitina	4.30 \pm 1.84	11.92 \pm 19.39	2.49 \pm .8135
Prolina	14.86 \pm 8.36	14.44 \pm 4.61	5.80 \pm 2.46
Serina	9.24 \pm 4.29	8.11 \pm 2.20	5.22 \pm 1.25
Tirosina	6.24 \pm 2.94	4.04 \pm 1.49	2.38 \pm .76
Treonina	15.84 \pm 3.36	12.31 \pm 2.54	8.47 \pm 1.66
Valina	17.16 \pm 7.23	9.28 \pm 4.23	4.11 \pm 1.43

Tabla anexa 2: Hormona del Crecimiento.

	Primer trimestre	Crecimiento normal	RCIU
HORMONA DE CRECIMIENTO (ng/mL)	12.57 \pm 5.42	3.83 \pm 1.65	7.26 \pm 4.99

Tabla 2.-Valores de aminoácidos totales en ambos compartimentos
valores en micromolas/100 ml.

Total	Total	28/35	28/35	28/35	28/35
plasma	L.A.	Plas cn	Plas RCIU	La CN	La RCIU
240.97	270.16				
235.37	217.38	233.12	237.63	221.55	213.05
255.65	175.64	274.1	237.42	175.49	175.78

Gráfico 1 En azul los valores totales maternos y en color rojo los fetales a lo largo del embarazo.
Se representan también los totales en los grupos con crecimiento fetal normal y anormal.

Valores Individuales

Los aminogramas de cada caso evaluado presentan una gran homogeneidad cuando se compararan con los demás, sobre todo si pertenecen a la misma edad gestacional. Si bien existen diferencias en las cantidades individuales totales, la distribución de cada a.a. lleva a un patrón que se reproduce constantemente. En el líquido amniótico de fetos con retraso en el crecimiento se respeta el mismo principio de distribución del aminograma, sin embargo, se observa una mayor dispersión en sus valores.

En las siguientes gráficas se representan los aminogramas individuales, en los diferentes grupos de edad gestacional y subgrupos con crecimiento fetal y anormal.

En la línea correspondiente a las ordenadas, se representa cada aminoácido con su número correspondiente y cada serie corresponde a cada caso evaluado.

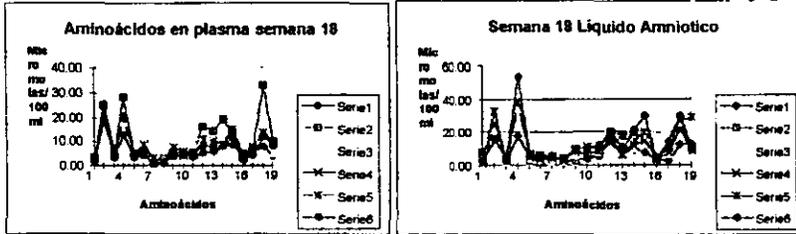


Gráfico 2 Semana 18 de embarazo Cada uno de las series corresponde a los casos 42,47,50,10,25,22 en ese mismo orden.

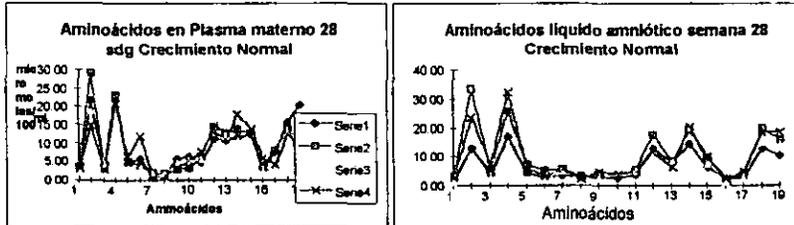


Gráfico 3 Semana 28 crecimiento normal Cada uno de las series corresponde a los casos 27,8,57,3 en ese mismo orden.

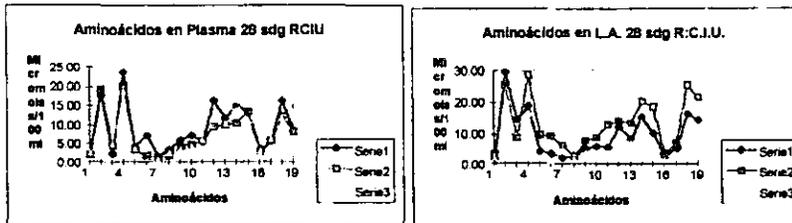


Gráfico 4 Cada uno de las series corresponde a los casos 23,24,21 en ese mismo orden.

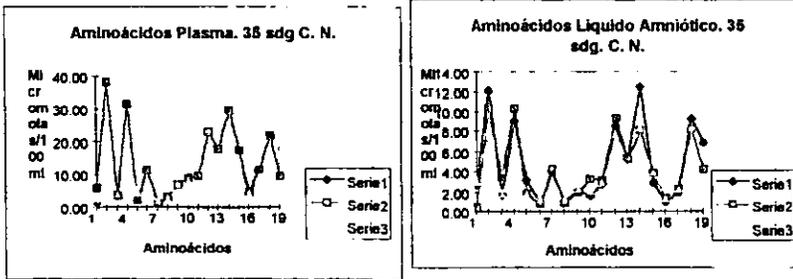


Gráfico 5 Cada uno de las series corresponde a los casos 15,17,18 en ese mismo orden.

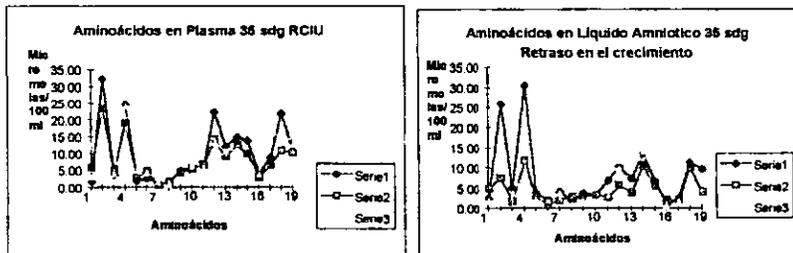


Gráfico 6 Cada uno de las series corresponde a los casos 1,26,13 en ese mismo orden.

Tendencias Individuales

La evaluación de cada aminoácido a lo largo del embarazo no muestra diferencias con respecto a la tendencia general a aumentar por parte de los a.a. maternos y de disminuir por los a.a. en líquido amniótico. Es importante señalar que algunos a.a. muestran un comportamiento diferente al resto.

En líquido amniótico de fetos con crecimiento normal todos los a.a. disminuyen con excepción de aspartato, glicina, citrulina, ornitina y cistina. En estos cuatro a.a. no hay modificaciones a lo largo del embarazo lo cual hace que su contribución individual al total sea mayor en etapas avanzadas de la gestación. Dicha conducta en la disminución total de a.a. no se observa tan claramente en fetos con retraso en el crecimiento.

Diferencias de Medias de cada aminoácido de acuerdo a la edad gestacional y a las características de crecimiento fetal.

Tabla 3 Diferencias de los aminoácidos a lo largo del embarazo en grupos con crecimiento fetal normal y anormal.

A la izquierda se acota el valor de T y a la derecha de cada casilla el valor de p. (micromolaz/100ml).

	18/28 c.n.	18/28 rciu	18/35 cn	18/35 rciu
alanina	2.17 p=.062	ns	3.90 p=.006	2.29 p=.056
arginina	-	ns	3.57 p=.009	2.81 p=.026
fenilalanina	2.59 p=.041	ns	2.55 p=.038	2.42 p=.046
ac glutamico	-	ns	3.66 p=.008	-
histidina	2.91 p=.020	ns	3.73 p=.007	2.40 p=.048
isoleucina	3.28 p=.01	ns	-	3.40 p=.040
leucina	2.22 p=.058	ns	2.50 p=.040	2.60 p= 0.35
lisina	2.30 p=.051	ns	4.13 p=.004	3.73 p=.007
prolina	-	ns	2.84 p=.030	-
serina	-	ns	2.42 p=.058	-
tirosina	2.25 p=.065	ns	2.38 p=.049	-
treonina	-	ns	3.62 p=.009	3.32 p=.013
valina	2.99 p=.025	ns	3.16 p=.016	2.83 p=.025
metionina	-	ns	3.18 p=.021	-
glicina	-	ns	-	-
cisteina	-	ns	-	-
ornitina	-	ns	-	-
citrulina	-	ns	-	-
ac aspartico	-	ns	-	-

En la tabla 3 se observa la diferencia de los aminoácidos en líquido amniótico a disminuir a lo largo del embarazo. Las diferencias presentes en la semana 18-28 son aun mas evidentes cuando se llega a la semana 35.

Cuando se evalúan embarazos con RCIU, las diferencias son menores, en la semana 28 los valores no muestran diferencias con los valores de la semana 18, lo cual significa que su concentración se sigue manteniendo alta.

En plasma los aminogramas muestran una ligera tendencia al aumento en casi todos los a.a. , hasta el final del embarazo con excepción de citrulina, ornitina y tirosina que se mantienen igual.

No hay diferencias entre ninguno de los grupos evaluados en plasma materno.

Relación Plasma-Líquido Amniótico

En embarazos con crecimiento fetal normal se observa una tendencia a la separación en los valores del aminoagrama, los maternos aumentan y los fetales

disminuyen, dicha separación no es tan clara en embarazos con RCIU, dicha diferencia entre ambos valores es menor.

**Aminoácidos no Esenciales,
Esenciales en líquido amniótico y
plasma materno durante el
embarazo**

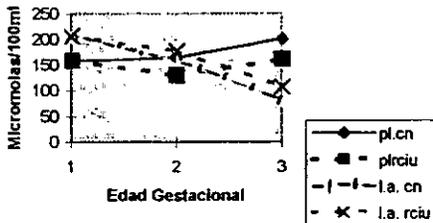


Gráfico 7 Aminoácidos a lo largo del embarazo, con líneas punteadas se acotan los valores maternos y de líquido amniótico en fetos con retraso en el crecimiento

Ya se ha mencionado el hecho de que los aminogramas muestran un comportamiento muy homogéneo, o dentro de la misma edad gestacional. Dicho comportamiento es muy parecido al materno en el que las proporciones entre a.a. se mantienen a pesar de que varíe la edad gestacional o se instale un retraso en el crecimiento.

La alta relación entre los valores maternos y fetales se aprecia en las siguientes gráficas, en las cuales se incluye el número del a.a. correspondiente y el porcentaje en su aporte al total.

En el círculo interno se muestran los valores maternos y en el externo los fetales.

Cuando se sobreponen ambas áreas (Materna y Líquido Amniótico), se observa en la semana 18 el aumento de a.a . en LA sobre los maternos invirtiéndose esta relación al final del embarazo. Cuando se evalúan a los embarazos con fetos con retraso en el crecimiento, se observa que dicha tendencia no es tan marcada, llegando incluso a modificarse totalmente, pareciera que en el líquido amniótico de fetos con retraso en el crecimiento se trata de mantener una poza de aminoácidos más alta que en el LA de los fetos con crecimiento normal.

Pero aún tratándose de un embarazo con un feto con crecimiento normal o anormal la delimitación del área obtenida en la distribución por radar muestra una alta relación entre los valores maternos y del líquido amniótico.

Se presentan en forma ordenada cada caso con ambos aminogramas. Los números corresponden al valor asignado a cada aminoácido.

Semana 18 de Gestación Serie uno corresponde a Valores Fetales y Serie 2 a valores maternos

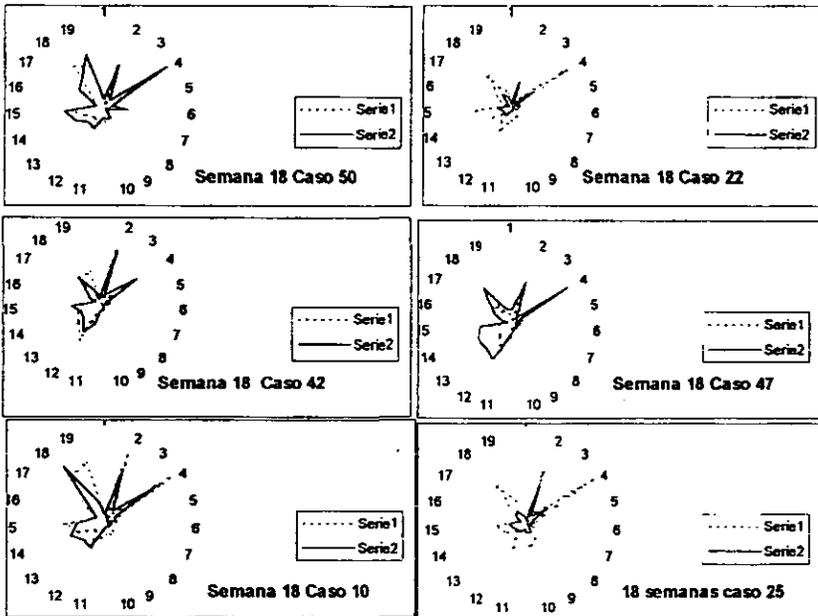


Gráfico 9 Imagen de radar de aminoácidos maternos representados en líneas punteadas y maternos en continuas La distribución de los aminoácidos corresponde a su número de identificación.

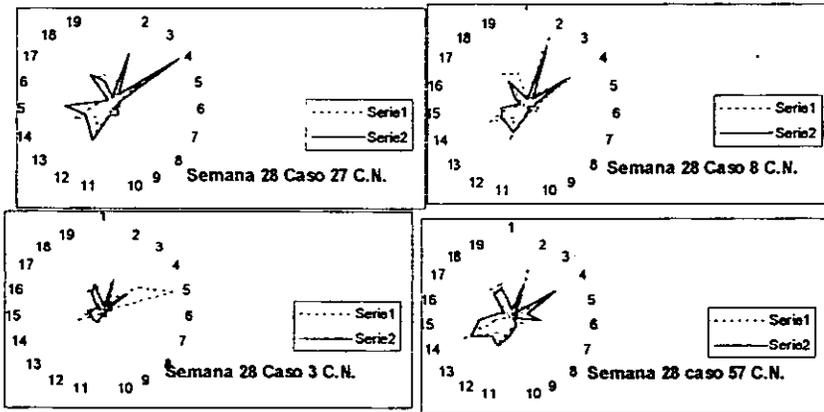


Gráfico 10 Semana 28, crecimiento fetal normal.

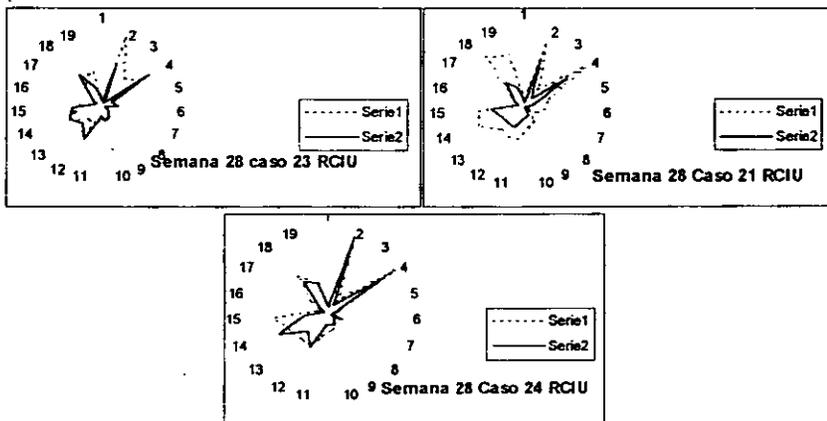


Gráfico 11 Semana 28, fetos con retraso en el crecimiento intrauterino.

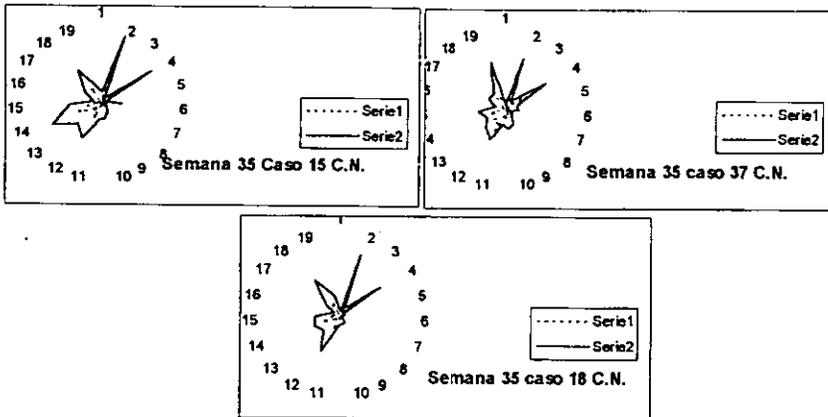


Gráfico 12 Semana 35 Crecimiento fetal normal.

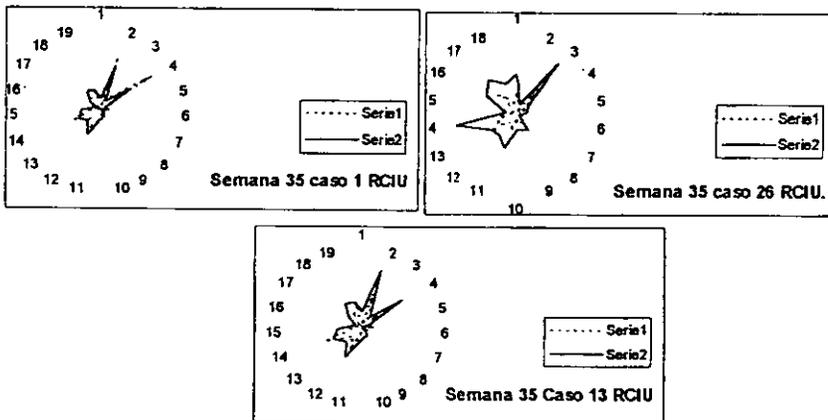


Gráfico 13 Semana 35 Retraso en el crecimiento Intrauterino.

Dicha relación entre los aminoácidos de ambos compartimentos se hace más evidente cuando se evalúa a través del coeficiente de correlación (r) de Pearson.

Tabla 4.- Correlación entre valores maternos y fetales
Se acota la edad gestacional y el crecimiento fetal normal o anormal.
Todos los valores de r de Pearson con valor de p menores a 0.05.

Par # 25 18 sdg	.979	Par # 21 28 sdg RCIU	.878
Par # 42 18 sdg	.939	Par # 23 28 sdg RCIU	.743
Par # 47 18 sdg	.831	Par # 24 28 sdg RCIU	.936
Par # 10 18 sdg	.872	Par # 18 35 sdg CN	.901
Par # 50 18 sdg	.840	Par # 15 35 sdg CN	.863
Par # 22 18 sdg	.804	Par # 37 35 sdg CN	.710
Par # 57 28 sdg C.N.	.808	Par # 26 35 sdg RCIU	.712
Par # 27 28 sdg C.N.	.860	Par # 1 35 sdg RCIU	.907
Par # 3 28 sdg CN	.811	Par # 13 35 sdg RCIU	.844
Par # 8 28 sdg CN	.911		

La alta correlación se observa en todas las edades gestacionales y en los grupos con crecimiento fetal normal y anormal.

Perfiles de Aminoácidos

El análisis de los diferentes a.a en grupos que comparten ciertas características estructurales y/o funcionales puede aportar información con respecto a su interrelación. Se han dividido en tres categorías: aminoácidos esenciales/no esenciales, grupos de a.a. con características químicas comunes y grupos de a.a. en relación a su incorporación a la producción de energía.

Aminoácidos esenciales/no esenciales?

Tabla 5 Aminoácidos no Esenciales

Nombre	Abr	#	Nombre	Abr	#
Ácido Glutámico	Glu	2	Citrulina	Cit	3
Alanina	Ala	4	Ornitina	Orn	5
Arginina	Arg	6	Tirosina	Tir	9
Serina	Ser	13	Cisteína	Cis	7
Glicina	Gli	14	Ácido Aspártico	Asp	1
Prolina	Pro	19			

Tabla 6 Aminoácidos esenciales

Nombre	Abr	#	Nombre	Abr	#
Lisina	Lis	18	Treonina	Tre	12
Valina	Val	15	Isoleucina	Ile	16
Histidina	His	11	Leucina	Leu	17
Fenilalanina	Phe	10	Metionina	Met	8

Tabla 4.- Correlación entre valores maternos y fetales
 Se acota la edad gestacional y el crecimiento fetal normal o anormal.
 Todos los valores de r de Pearson con valor de p menores a 0.05.

Comparación	Esenciales	No Esenciales
18-28 CN	no diferencia	2.99 p=.017
18-28 RCIU	ns	ns
18-35 CN	3,35 p=.006	466 p=.002
18-35 RCIU	2.31 p=.055	4.03 p=.005
28-35 CN	4.01 p=.01	3.91 p=.011
28-35 RCIU	ns	ns
28 CN/RCIU	ns	ns
35 CN/RCIU	ns	ns
Total CN/RCIU	ns	ns

En la tabla 7 se observa que no hay Diferencias cuando se comparan los valores de crecimiento fetal normal y anormal en la misma edad gestacional. Cuando la comparación se realiza a lo largo del embarazo se hace patente la tendencia a la disminución en los grupos normales, la cual no sigue las mismas pautas en los casos de retraso en el crecimiento. Así mismo es importante señalar que los a.a . esenciales son los que menos varían.

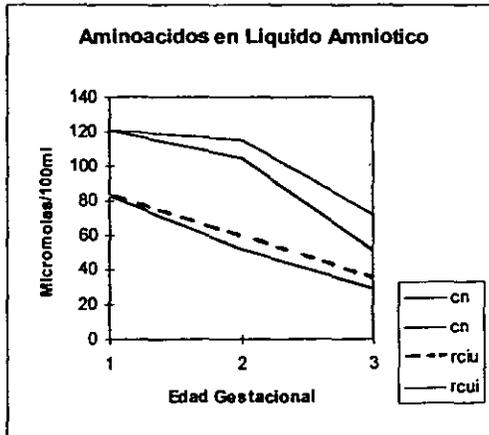


Gráfico 13 Aminoácidos esenciales y no esenciales en líquido amniótico en los grupos con crecimiento normal y anormal. Se observan los valores constantemente mas elevados en los casos de retraso en el crecimiento.

Ambos grupos varían en plasma materno, sin embargo se observa la tendencia a aumentar conforme avanza el embarazo.

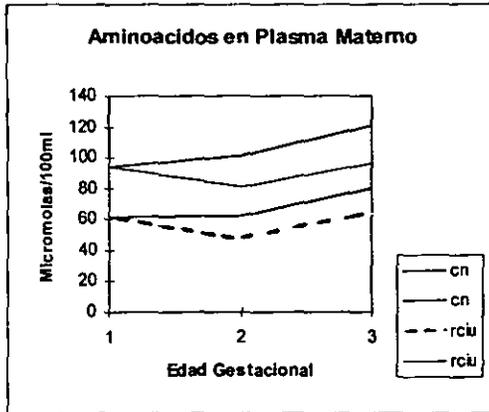


Gráfico 14 Aminoácidos esenciales y no esenciales en plasma materno.

Cuando comparamos aminoácidos entre plasma materno y líquido amniótico se observa que en los no esenciales, su disminución es más aparente. Los esenciales tienden a presentar menos diferencias entre ellos, lo cual significa que sus valores entre ambos compartimentos están más cerca unos de otros.

Tabla 8 Comparación entre los grupos de aminoácidos maternos y fetales. Obsérvese en los fetos con retraso en el crecimiento las menores diferencias con respecto a las maternas.

Grupos	Esenciales	No esenciales
18	ns	ns
28 CN	ns	ns
28 RCIU	ns	ns
35 CN	4.13 p=.015	4.78 p=.009
35 RCIU	ns	3.19 p=.033

Perfiles de Aminoácidos en Relación a su Características Bioquímicas

Se han dividido para su estudio:

Grupo 1.-Aminoácidos asociados al ciclo del ácido cítrico.

Acido Aspartico.

Acido Glutamico

Alanina

Citrulina

Ornitina

Grupo 2.- Aminoácidos Sulfurosos

Cisteína

Metionina

Grupo 3.-Aminoácidos Aromáticos

Fenilalanina

Histidina

Tirosina

Grupo 4.-Aminoácidos con radicales Hidroxilo

Treonina

Serina

Glicina

Grupo 5.- Aminoácidos de Cadena Ramificada.

Leucina

Lisina

Valina

Isoleucina.

Grupo 6.- Aminoácidos Ciclos.

Prolina

Valores de medias en Líquido Amniótico

Tabla 9 Promedios en las diferentes edades gestacionales en micromolas por 100/ml.

Se acotan en **negrita** los valores más altos en el grupo con Retraso en el crecimiento con respecto al grupo de crecimiento normal a la misma edad gestacional

	18 sdg	28sdg cn	28 sdg rciu	35sdg cn	35sdg rciu
1	72.22	58.17	65.66	26.03	42.55
2	5.91	6.99	5.51	4.23	4.79
3	22.27	11.35	17.11	7.06	9.17
4	42.35	38.46	36.33	22.98	26.48
5	51.34	29.10	34.18	21.27	16.66
6	14.86	14.51	17.79	4.71	6.88

Se observan diferencias solo al final del embarazo. En la semana 28 no se encuentran datos consistentes de diferencia entre los grupos con crecimiento fetal normal y anormal.

Tabla 10 Medias de los grupos bioquímicos en líquido amniótico de fetos con crecimiento normal y con retraso en el crecimiento, se marcan con negritas los valores mas altos en el grupo con retraso en el crecimiento intrauterino

	C.N.	R.C.I.U.
1	44.39	54.10
2	5.80	5.15
3	9.51	13.14
4	31.83	31.41
5	25.74	25.42
6	10.31	12.34

Diferencias de Medias.

Aminoácidos en Líquido amniótico.

Tabla 11 Diferencias entre medias de los diferentes grupos con características químicas similares, no hay diferencias estadísticas entre los grupos con crecimiento normal/retraso en el crecimiento. Obsérvese las diferencias entre los a.a. de la semana 18 y al final del embarazo, estos mismos comparados con el grupo de retraso en el crecimiento muestran una diferencia menor. A la izquierda el valor de T, y a la derecha el valor de p.

	18/28 cn	18/28 rciu	18/35 cn	18/35rciu	28 cn/rciu	35 cn/rciu
1	-	-	5.50 p= .001	2.50 p= .03	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2.93 p= .022	2.43 p=.046	-	-
4	-	-	3.35 p =.012	2.60 p=.036	-	-
5	2.83 p= 0.03	-	2.78 p= .027	3.40 p=.010	-	-
6	-	-	2.84 p= .030	2.10 p=0.70	-	-

Valores de medias en plasma materno

Tabla 12 Promedios en las diferentes edades gestacionales en micromol por 100/ml. Se acotan en negrita los valores mas altos en el grupo con crecimiento normal con respecto al grupo de RCIU en la misma edad gestacional

	18 sdg	28sdg cn	28 sdg rciu	35sdg cn	35sdg rciu
1	59.77	60.19	53.00	70.02	56.73
2	3.02	2.26	2.77	3.23	2.06
3	14.14	14.24	14.29	20.32	16.14
4	30.15	38.20	36.09	49.85	34.82
5	38.63	36.49	33.32	36.87	38.91
6	10.17	11.26	9.12	13.21	10.92

Tabla 13 Promedios en plasma materno. Se marcan con negritas los valores mas altos en el grupo con crecimiento fetal normal

	C.N.	R.C.I.U.
1	64.40	54.87
2	2.68	2.42
3	16.85	15.21
4	43.19	35.46
5	36.65	36.11
6	12.10	10.02

No hay diferencias entre las medias de los grupos con asociaciones bioquímicas en los aminoácidos maternos.

GRUPOS DE AMINOACIDOS DE ACUERDO A SU CAPACIDAD DE INGRESAR AL CICLO DE ENERGIA.

Se han clasificado:

Grupo 1.-Aminoácidos Puramente Cetogénicos

Leucina

Lisina.

Grupo 2.-Aminoácidos con características cetogénicas y glucogénicas

(Mixtos).

Isoleucina

Fenilalanina

Tirosina

Grupo 3.- Aminoácidos que aportan un esqueleto de tres carbonos al ciclo del ácido cítrico y se incorporan como Piruvato

Alanina

Glicina

Cisteina

Serina

Treonina.

Grupo 4.-Aminoácidos que aportan un esqueleto de cuatro carbonos al ciclo del ácido cítrico y se incorporan como Oxalacetato.

Aspartato

Ornitina

Grupo 5.- Aminoácidos que aportan un esqueleto de cinco carbonos al ciclo de ácido cítrico y se incorporan como Alfa-ceto-Glutarato a través de Glutamato.

Histidina

Acido Glutamico
 Prolina
 Arginina

Grupo 6.- Aminoácidos que se incorporan a través de Succinil CoA, se incluyen Valina y Metionina

Valores de medias en Líquido Amniótico

Tabla 13 Se marcan en negrita los valores del grupo de retraso en el crecimiento mayores que el grupo con crecimiento normal a la misma edad gestacional. Se expresan en micromolaz/100 ml.

	18 sdg	28sdg cn	28 sdg rciu	35sdg cn	35sdg rciu
1	31.26	19.58	21.27	9.96	10.80
2	16.53	8.53	12.22	5.32	6.21
3	81.16	70.01	69.25	37.31	46.77
4	7.10	6.70	7.14	4.13	5.72
5	49.25	43.85	50.37	18.43	27.78
6	19.69	10.22	12.99	4.40	6.55

Relación de Aminoácidos por grupos de energía en casos totales con crecimiento fetal normal y anormal.

Tabla 14 Medias de los grupos de energía en líquido amniótico de fetos con crecimiento normal y anormal. Los promedios se expresan en micromolaz/100 ml. Se acotan en negrita los valores mayores en el grupo de retraso en el crecimiento.

	C.N.	R.C.I.U.
1	15.46	15.99
2	7.15	9.21
3	56.0	58.01
4	5.60	6.43
5	32.96	39.08
6	7.72	9.77

Diferencias de Medias.

Aminoácidos en Líquido amniótico.

Tabla 15 Diferencias de medias de los grupos de energía a lo largo del embarazo, a la izquierda se acota el valor de T y a la derecha el de p

	18/28 cn	18/28 rciu	18/35 cn	18/35rciu	28 cn/rciu	35 cn/rciu
1	2.25 p=.05	-	3.65 p=.008	3.45 p=.01	-	-
2	2.70 p=.02	-	3.25 p=.014	2.90 p=.023	-	-
3	-	-	3.78 p=.007	2.76 p=.028	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	3.86 p=.006	2.33 p=.054	-	-
6	2.29 p=.05	-	3.29 p=.015	2.71 p=.03	-	-

Diferencias entre medias de los diferentes grupos.

Es de notar que las diferencias en los grupos de crecimiento normal son mayores conforme avanza el embarazo, estas no son tan claras en los fetos con retraso en el crecimiento intrauterino

Valores de medias en Plasma Materno.

Tabla 16 Promedios de los grupos de energía en plasma materno

	18 sdg	28sdg cn	28 sdg rciu	35sdg cn	35sdg rciu
1	22.87	19.03	18.48	26.09	21.35
2	12.13	12.04	11.64	17.51	13.23
3	57.65	69.98	60.77	79.19	60.24
4	6.09	6.81	5.15	5.52	7.56
5	42.78	43.98	38.27	56.29	41.29
6	15.06	15.01	14.14	16.12	16.06

Promedios expresados en micromolas/100 ml. Se acotan en negritas los valores mas altos en las madres con crecimiento fetal normal comparados con las que presentan retraso en el crecimiento intrauterino.

Relación de Aminoácidos por grupos de energía en casos totales con crecimiento fetal normal y anormal

Tabla 17 Promedio de los grupos de energía en plasma materno en fetos con crecimiento normal/anormal

	C.N.	R.C.I.U.
1	22.05	19.92
2	14.38	12.44
3	71.64	60.51
4	6.26	6.15
5	49.02	39.83
6	15.46	15.13

Se acotan en negra los valores mayores de las mujeres con fetos con crecimiento normal.

Hormona del Crecimiento.

En la siguiente tabla se muestran los resultados individuales en los diferentes grupos estudiados.

Tabla 18 Valores de hormona del crecimiento en los tres grupos estudiadas

16-18 sdg	Cre. NL	RCIU
16.60	2.80	12.10
7.70	3.70	5.10
20.00	3.60	14.00
17.50	5.80	15.00
25.00	3.40	8.20
12.00	3.00	2.10
8.70	5.80	8.20
7.50	4.90	6.00
9.70	4.70	12.00
16.00	2.60	3.80
15.50	2.60	17.50
9.70	2.40	5.90
15.50	3.30	14.00
15.50	2.30	3.60
15.00	3.90	2.80
7.70	2.90	3.00
4.30	3.90	3.40
5.80	3.30	2.80
6.40	3.70	3.30

En la siguiente tabla se muestra la descripción de los datos en los tres grupos.

Tabla 19 Estadísticas descriptivas de los grupos.

	Media	Des/Es	Min	Max
Prim	12.58	5.42	5.8	25.0
Cr NI	3.83	1.66	2.3	9.5
RCIU	7.26	4.99	2.1	17.50

Se grafican los valores en las medias de los tres diferentes grupos.

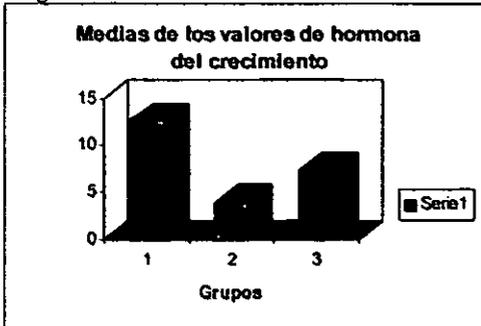


Gráfico 15 Valor medio de hormona del crecimiento en cada grupo estudiado

El análisis de diferencias por medio de la prueba de T entre los grupos con crecimiento normal y anormal arroja los siguientes datos.

Tabla 20 valores de la comparación de hormona del crecimiento en líquido amniótico entre los grupos de crecimiento fetal normal/anormal

Valores por grupos	
Media Crecimiento Normal	3.83
Desviación Estándar	1.659
Error Estándar de la media	.371
Media R.C.I.U.	7.26
Desviación Estándar	4.99
Error Estándar de la Media	1.11

Tabla 21 Resultados de la comparación de medias hormona del crecimiento en liquido amniótico. Fetos con crecimiento normal y con retraso en el crecimiento intrauterino

Valores de las diferencias	
Media	-3.42
Desviación Estándar	4.7
Error Estándar de la media	.1.07
Valor de T	-3.20
Grados de Libertad	19
Valor de p (dos colas)	.005

La hormona del crecimiento muestra un comportamiento muy similar a la de los aminoácidos en liquido amniótico. Ambos tienden a disminuir en los embarazos con crecimiento fetal normal y a mantenerse ligeramente elevados en los casos con retraso en el crecimiento intrauterino..

El análisis de correlación entre hormona del crecimiento y los valores de aminoácidos a lo largo del embarazo muestra

Correlación de Valores de Hormona del Crecimiento con los diferentes aminoácidos.

Tabla 22 Valores de r de Pearson de Hormona del crecimiento y aminoácidos en liquido amniótico.

Primera columna valores generales a lo largo del embarazo.

Segunda Columna fetos con crecimiento normal.

Tercera Columna fetos con retraso en el crecimiento.

* p menor a 0.05.

Aminoácido	En total	Crecimiento Normal	RCIU
Alanina	.6735	.9047*	.5311
Arginina	.6461	.7678	.9946*
Aspartato	.043	.2966	.1673
Cisteina	.2271	.4398	.6723
Citrulina	.2133	.9263*	.4579
FenilAlanina	.7079*	.1981	.9011*
Glicina	.2101	.4155	.9451*
Glutamato	.4288	.5935	.4481
Histidina	.7276	.3407	.9221*
Isoleucina	.6964*	.7288	.8421*
Leucina	.5462*	.9337*	.9146*
Lisina	.7371*	.6571	.1301
Metionina	.1959	.4596	.9632*
Ornitina	.2726	.9614*	.2072
Prolina	.1942	.1884	.9278*
Serina	.4120	.5487*	.4436
Tirosina	.6740*	.9087*	.8892*
Treonina	.5576*	.4980	.7568
Valina	.6994*	.7562	.9453*

Tabla 23 Correlación de la Hormona del Crecimiento con Los grupos de aminoácidos que comparten características bioquímicas.

	HC/Amoniac. Totales	HC/ Crecim. Normal	HC/ R.C.I.U.
1	.6608 p=.002	.8895 p=.007	.7106 -
2	.2848 -	.6768 -	.8016 p=.05
3	.6774 p=.001	.6316 -	.9346 p=.006
4	.6393 p=.002	.5969 -	.9011 p=.014
5	.6748 p=.002	.6865 -	.9325 p=.007
6	.2522 -	.7242 -	.2036 -

Se establece a la izquierda el valor de r (Pearson) y a la derecha el valor de p.
La hormona del crecimiento muestra una mayor correlación con el comportamiento de los aminoácidos de los fetos con retraso en el crecimiento.

Tabla 24 Correlación de la Hormona del Crecimiento con los grupos de energía

	HC/Aminoac. Totales	HC/ Crecim. Normal	HC/ R.C.I.U.
1	.6852 p=.001	.8144 p=.026	.9265 p=.008
2	.7510 p=.001	.6979 p=.081	.8937 p=.016
3	.6457 p=.003	.8145 p=.026	.8661 p=.026
4	.5155 p=.024	.8715 p=.011	.8496 p=.032
5	.6153 p=.005	.7423 p=.056	.8302 p=.041

A la izquierda se acota el valor de r (Pearson) y a la derecha el de p.

VI DISCUSIÓN

Las concentraciones obtenidas en los aminogramas maternos muestran una gran consistencia en las tres diferentes edades gestacionales en los cuales fueron valorados.

Los valores de aminoácidos totales en plasma materno no se modifican, si bien pareciera existir una tendencia a la disminución a lo largo del embarazo, las concentraciones se mantienen muy similares.

En el interior del aminograma, el valor de cada a.a. en relación al total también se conserva, existen siempre valores mayores de alanina, glutamina, lisina y como los menos abundantes metionina, aspartato y citrulina. Este orden de menor a mayor concentración muestra cambios muy pequeños en cada aminoácido ya sea a lo largo del embarazo o en la comparación entre diferentes pacientes. Los mismos hallazgos se encuentran en plasma de mujeres embarazadas con fetos que presentan retraso en el crecimiento intrauterino.

Las necesidades metabólicas de la madre y del feto pueden tener influencia en la disponibilidad de nutrientes, es probable que los que se encuentran en abundancia, sean regulados de manera más estrecha en la placenta. Esto puede sustentarse también en el hecho que los aminoácidos más abundantes son, en general, aquellos que pueden incorporarse a diversas rutas energéticas como es el caso de alanina, ácido glutámico, valina y lisina, que muestran variaciones hasta del 20% pero siempre se mantienen como los predominantes en los perfiles del aminograma. En comparación en cisteína y metionina (ambos fundamentales por los grupos sulfuros), los cuales se encuentran siempre en cantidades muy pequeñas; modificaciones de un 20% pueden significaren ellos una gran diferencia.

Dada la diversidad de sus funciones es muy difícil establecer una mayor importancia de algunos a.a. sobre otros, sin embargo algunos son más versátiles en su incorporación a las diversas rutas metabólicas y esta puede ser la razón por la cual el organismo establece un control en los diferentes sistemas de captación/transporte en la placenta. Lo anterior se hace patente cuando se evalúa el resultado de diferentes estudios en los que se confirma la reproducibilidad de los perfiles de los aminogramas. Ya en 1971 Reid y cols. reportan que el aminograma materno es muy constante durante todo el embarazo y que el único a.a. que disminuye es la glutamina. (72).

En 1975 Moghissi y cols en un estudio de cohorte en mujeres de diferente nivel socioeconómico valoran los aminogramas maternos a lo largo de la gestación y los comparan con los pesos de los neonatos y con su desarrollo psicomotor a los 8 meses de edad. En las mujeres que se encuentran que en el subgrupo de nivel socioeconómico bajo, los aminogramas no se modifican a pesar de que tienen una mayor frecuencia de neonatos de bajo peso.

En el mismo estudio en aquellas mujeres en las cuales el efecto de la desnutrición era de corto plazo, representado este grupo por mujeres que recientemente habían disminuido en su nivel socioeconómico, tuvieron un menor número de neonatos de bajo peso a pesar de tener una ingesta calórica

similar que las embarazadas con un nivel socio económico constantemente bajo. Con estos datos concluye que es menos probable que una mujer con una buena alimentación previa al embarazo desarrolle fetos con RCIU.

Otro ejemplo de la consistencia en las mediciones de los a.a. en plasma es reportado por Schoenglod en 1978 quien registra muy ligeros cambios de los a.a. a través del embarazo. Aunque este autor en esa época, probablemente por la falta de información que apoyara este concepto indica que este hallazgo debiera ser corroborado posteriormente. Un buen número de los artículos publicados desde entonces hacen referencia a la alta reproducibilidad de los patrones de aminoácidos maternos. Lo anterior permite inferir que para el organismo es importante mantener una concentración constante de a.a. libres, lo que le permite una disponibilidad a los tejidos en sus necesidades individuales de a.a..

Uno de los razones para que se presente un RCIU parece ser la inadecuada ingesta de nutrientes, lo cual explica que esta condición se presente en mujeres desnutridas; sin embargo la presencia clínica del RCIU es poco probable que sea debida por un cambio en los valores plasmáticos de aminoácidos.

Cuando el estado de desnutrición es muy severo y este altera la concentración de aminoácidos, es menos probable que exista un embarazo y que se presente una muerte fetal temprana. Shoenglod refiere encontrar diferencias en el aminograma sólo en mujeres que sufrieron aborto, en el resto de mujeres incluidas en su estudio no mostró cambios a partir del segundo trimestre.

Lo anterior se puede apoyar en las observaciones que se han hecho en grandes poblaciones en las que la ingesta proteica es menor. En este caso, a pesar de que no hay grandes modificaciones en el aminograma, existe una menor ganancia de peso materno y fetal durante el embarazo.

De acuerdo con esta información, nuestros resultados son similares a lo que se ha reportado previamente en la literatura, en que los aminoácidos plasmáticos maternos no sufren modificaciones a lo largo de la gestación.

Los valores en líquido amniótico de los diferentes a.a. muestran una disminución en sus concentraciones totales hacia el final del embarazo. En los fetos con crecimiento anormal se observa una tendencia al aumento en la concentración total de aminoácidos, si bien dicho aumento no llega a tener una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan con los fetos con crecimiento normal.

Las posición de cada a.a. en el aminograma se mantiene muy constantes, sin embargo la movilidad de a.a. en especial los de cadena ramificada es mayor que en plasma materno. Del mismo modo los a.a. esenciales aumentan ligeramente en fetos con retraso en el crecimiento. Lo anterior da como resultado que los valores al final del embarazo tengan esa ligera elevación.

La disminución de las concentraciones de los aminoácidos conforme avanza el embarazo es más evidente en fetos con crecimiento normal sin embargo existen aminoácidos que no se modifican, lo cual descarta el concepto de que esta disminución se explique por un efecto diluyente de la orina como ha sido

sugerido últimamente. Esto se apoya en el hecho de que el aminograma en orina tiene un diferente comportamiento al del líquido amniótico.

Los aminoácidos maternos no muestran diferencias a lo largo de la gestación, tampoco cuando se comparan fetos con crecimiento normal y anormal. Así mismo los valores en líquido amniótico muestran una tendencia al incremento en fetos con crecimiento anormal que no alcanzan significancia estadística.

La hormona de crecimiento muestra así mismo una disminución a lo largo de la gestación, la cual es aún mas clara en fetos con crecimiento normal. En fetos con retraso en el crecimiento aún a pesar de que se mantiene la misma tendencia a disminuir, los valores encontrados son mucho mas altos que en los valores en fetos con crecimiento normal.

Esto implica de alguna manera que la síntesis/secreción de la hormona del crecimiento fetal es un mecanismo compensatorio a el estado de desnutrición, lo cual concuerda perfectamente con los hallazgos endocrinos de los estados desnutricionales en el humano.

En fetos con crecimiento anormal al parecer la disponibilidad de nutrientes en sangre materna no se altera, lo cual lleva a la conclusión de que es poco probable que las manifestaciones clínicas se deban a la que solamente el aminoácido requerido no se encuentre en adecuadas cantidades en el momento en que se necesita, para esto el organismo trata de mantenerlos en límites muy estrictos, sin embargo puede ser el origen de los aminoácidos sea lo que le confiera una mayor o menor calidad en la formación estructural.

Un ejemplo de esto se observa en adultos con shock séptico en los cuales en los estadios tardíos de la enfermedad existe una tendencia al "autocanibalismo" protéico, en el cual el individuo utiliza sus propios aminoácidos estructurales intentando mantener su "poza" metabólica, es entonces cuando las relaciones de los aminoácidos en sangre cambian totalmente, cuando esto sucede el proceso de enfermedad es ya muy severo.

Todo lo anterior permite establecer que la medición de a.a. maternos por lo menos ahora no pueda ser utilizada como un método de evaluación del estado fetal. El análisis del origen de los a.a. en plasma, pudiera ofrecer mas información.

En los trabajos de Cetin y Ronzoni (58) se analizan las proporciones entre los valores maternos y fetales, así se observa que la diferencia en los valores en ambos compartimentos es menor en los fetos con retraso en el crecimiento, lo anterior dado por una disminución en los valores maternos y un ligero aumento de los fetales. Esto podría explicarse por el incremento de los aminoácidos libres como consecuencia del catabolismo proteico fetal. Cuando se evalúan los datos con relación a la proporción de los aminoácidos con respecto del total se observa que estas proporciones se conservan en todos los grupos estudiados.

Nuestros resultados son parecidos a los que se reportan en la literatura encontrándose la misma tendencia a la disminución del gradiente materno-fetal en los embarazos complicados con RCIU.

A pesar de que no existen diferencias entre los grupos con crecimiento normal y anormal en la semana 28, cuando se comparan las concentraciones de aminoácidos de embarazos normales y complicados con RCIU con las observadas en la semana 18 es notorio que en el grupo con crecimiento normal 8 aminoácidos han disminuido considerablemente pero no así en el grupo con RCIU. En la semana 35 tampoco hay diferencias entre grupos con crecimiento normal y anormal, sin embargo las concentraciones de a.a. en el RCIU son siempre mayores que en los fetos con crecimiento normal.

En presencia de un RCIU, los valores de todos los a.a. siempre están más elevados que en el grupo con crecimiento normal, lo cual apoya la idea de fuentes alternas como recurso de la unidad feto-placentaria para mantener el aporte de nutrientes.

En fetos a los cuales se les han tomado muestras muy tempranas de aminoácidos en líquidos celómico, amniótico o sanguíneo y que son candidatos a interrupción por razones sociales, y en los que también se les realiza cariotipo, se han encontrado valores de a.a. diferentes en presencia de cromosopatías, lo cual tiene una lógica mayor ya que estos fetos desarrollan retraso en el crecimiento temprano, los cuales generalmente no llegan al final del embarazo.

(12)

En el RCIU los aminoácidos que muestran un menor cambio son los de cadena ramificada y en especial los cetógenos, ellos tienden a elevarse a lo largo de la gestación, lo cual lleva a que su contribución al total sea mayor al final de embarazo.

Los resultados parecen paradójicos, debido a que en líquido amniótico los valores de a.a. son mayores en fetos con RCIU comparados con fetos con crecimiento normal, esto ya había sido observado en anteriores reportes y podría relacionarse con un cambio de las rutas metabólicas para favorecer la gluconeogénesis, necesaria para mantener el principal combustible celular. En estudios de cordocentésis, que reflejarían el comportamiento del feto, se ha reportado una disminución de a.a., sin embargo esto no ha sido corroborado en otros estudios en los que de hecho se encuentra que algunos a,a, aumentan en presencia de RCIU. (12,58)

Es también poco probable pensar que las membranas amniótica y coriónica pierdan su capacidad de transporte y secreción a lo largo del embarazo, siguen estando en contacto con el endometrio y este sigue estando bajo la influencia hormonal y placentaria.

Dada la alta eficiencia del organismo y de los diferentes sistemas de adaptación es poco probable que esta interface endometrio/membranas deje de funcionar, es más factible pensar que es una alternativa mas para mantener el ingreso de nutrientes.

De tal forma que en estos estados de adaptación diversas señales hormonales

puedan influir Los reportes de hGH en fetos con crecimiento normal evaluada en sangre han mostrado disminución en sus valores a lo largo del embarazo. (43,47) Se ha reportado que en casos con RCIU esta hormona aumenta, lo cual se ha asociado a una alteración en el sistema de retroalimentación de IGF-I/hGH, sin embargo estos fetos crecen y muchos de ellos llegan al termino, tal vez no lo suficiente para alcanzar un tamaño dentro de los marcos referidos como normales pero lo suficiente para alcanzar el tercer trimestre, lo anterior significa que tuvo que adaptarse a las circunstancias intrauterinas adversas. La función de hormona del crecimiento puede estar asociada a la movilización de nutrientes y a un aumento en su transporte, el hecho de que se encuentre presente desde edades tempranas del embarazo puede corresponder a este fin. En fetos anencefálicos se ha visto una disminución de su crecimiento cuando no esta presente esta hormona. Las diferencias en nuestros tres grupos de estudio son altamente significativas.

Estos datos parecen indicar que al presentarse un retraso en el crecimiento los valores de aminoácidos se mantienen muy constantes y que esto se debe en parte a la acción de hormonas reguladoras del metabolismo.

Lo que resulta de mayor interés en el presente trabajo es las semejanzas encontradas en los perfiles de aminoácidos plasmáticos maternos y en líquido amniótico así como la asociación que muestran estos con la hormona del crecimiento.

La similitud de los aminogramas se observa mas claramente cuando se evalúa la proporción de cada aminoácido con respecto del total. Si bien a lo largo del embarazo existe una disminución de la concentración de a.a. totales en líquido amniótico sin que esta varíe en plasma materno, cuando se evalúa al interior del aminograma la consistencia es muy alta en ambos compartimentos. Del mismo modo, los resultados son muy parecidos cuando se comparan entre si los fetos con crecimiento normal y los que tienen RCIU.

La similitud de los perfiles de a.a. en el suero y en líquido amniótico pareciera sugerir que los a.a en el líquido amniótico provienen principalmente del compartimento materno, sin embargo existen diferencias que hacen sospechar que el control de la concentración de estos compuestos en el líquido amniótico es regulado de manera autónoma.

En los trabajos de Giltlin (70) se observa que el feto es capaz de ingerir el 50% del líquido amniótico producido diariamente lo cual plantea la posibilidad de que exista otro u otros factores asociados al reciclaje del líquido. En el mismo estudio se explora el aporte protéico del líquido amniótico basados en sus concentraciones de a.a. Reporta que el feto a término requiere aproximadamente 2 gramos de proteína por kilogramo por día. El líquido amniótico provee al feto sólo del 10% de esta cantidad, su aporte no parece ser importante para las necesidades energéticas totales, sin embargo en fetos con atresia esofágica se puede presentar hasta un 30% menos peso que los controles normales.

Lo anterior plantea la posibilidad de que la concentración de aminoácidos en

líquido amniótico sean provenientes al menos en parte de la madre y que no sólo sea a través de la placenta como se aporten substratos al feto sino también a través del líquido amniótico.

Nuestros resultados parecen indicar que el líquido amniótico tiene un comportamiento muy estable de su aminograma, al parecer diferente a otros fluidos, entre ellos la orina fetal, de la cual aparentemente provienen la mayoría de sus elementos constitutivos. Teniendo un recambio tan activo y constante se podría pensar en que es poco probable que se mantengan estos niveles tan bien delimitados.

A la luz de nuestros resultados la concentración de la hormona del crecimiento esta aumentada cuando existe RCIU. Así mismo su correlación con la concentración de algunos de los a.a es alta, particularmente con los aminoácidos de cadena ramificada que son precursores inmediatos para la síntesis de glucosa.

Dada la complejidad de la regulación hormonal de las rutas del metabolismo intermediario no se puede asumir directamente que la hormona del crecimiento sea el único modulador de la gluconeogénesis en la unidad feto-placentaria, sin embargo la alta asociación entre estas variables si la implica cuando menos parcialmente.

De acuerdo a la información en la literatura y a los resultados obtenidos en el presente estudio es muy probable que los aminoácidos en líquido amniótico al menos parcialmente provengan de los aminoácidos maternos, las vías por las cuales se incorporan no han sido descrito. Las membranas pueden al menos parcialmente tener esta función pero dada su amplia superficie de contacto con el área materna y de que el transporte a través de ellas es reconocido desde etapas tempranas del embarazo, es muy probable que a través de las membranas amnióticas ocurran los fenómenos de transporte de aminoácidos

Así mismo es importante hacer notar que la alta reproducibilidad en su concentración de a.a. en líquido amniótico habla de la importancia para el organismo de mantener estas concentraciones en un margen estrecho.

Uno de los argumentos a favor del papel predominante que tiene la hormona del crecimiento como modulador de las concentraciones de a.a. en el líquido amniótico es el hecho de que esta correlación se encuentra presente desde la semana 16-18. Otro es la relación que tiene con los aminoácidos esenciales y en especial con los de cadena ramificada, isoleucina, leucina y lisina. En este estudio se aprecia que cuando menos uno de los a.a. que se incorporan al ciclo del ácido cítrico se incrementa en el líquido amniótico lo cual indica que estos pueden ser substratos en la producción de glucosa y/o energía.

La relación en los embarazos con RCIU entre los a.a. en el líquido amniótico y la hormona del crecimiento aportan una línea para explorar con mas detalle la relación entre los precursores metabólicos y las señales hormonales y su posterior asociación con crecimiento fetal normal y anormal. La búsqueda de indicadores de bienestar fetal como estos podrían establecer marcadores para

analizar en estudios longitudinales la capacidad pronostica de alguna de estas determinaciones aislada (hormona del crecimiento, arginina, leucina, isoleucina, valina), o bien formando una variable compuesta (hGH/Arg, hGH/Leu) en la determinación de los estados iniciales del desequilibrio entre la demanda y el aporte de nutrientes al feto. Con estas mediciones se esperaría que pudiera detectarse tempranamente el RCIU para establecer medidas terapéuticas o preventivas oportunas.

VII CONCLUSIÓN

En el presente trabajo hemos intentado establecer relaciones y diferencias en las concentraciones de a.a. y la hGH en el líquido amniótico y sangre materna, en embarazos con fetos con crecimiento normal y anormal. Los resultados muestran una elevada consistencia en las proporciones de aminoácidos tanto en el suero materno como en el líquido amniótico que se observa en embarazos complicados con RCIU y en embarazos normales. También se demuestra que a pesar de que hay un gradiente de concentración feto:materno en la concentración de a.a. totales, las proporciones de a.a. individuales se conservan en ambos compartimentos.

En el caso de los embarazos complicados con RCIU es notorio el cambio en el perfil del aminograma, cambio que se manifiesta por un incremento proporcional de los a.a. de cadena ramificada a lo cual acompaña un incremento en la concentración de la hormona del crecimiento. La relación entre la hGH y estos a.a., que se observa desde el inicio de la gestación sugiere que esta hormona es uno, si no es que el único modulador directo de sus concentraciones. En un futuro se recomendaría realizar estudios longitudinales en un intento de establecer si la determinación aislada de alguno de los a.a. en forma aislada, la hGH o bien la combinación de algunos de ellos pudiera ser utilizado como un indicador pronostico del estado de salud fetal.

analizar en estudios longitudinales la capacidad pronostica de alguna de estas determinaciones aislada (hormona del crecimiento, arginina, leucina, isoleucina, valina), o bien formando una variable compuesta (hGH/Arg, hGH/Leu) en la determinación de los estados iniciales del desequilibrio entre la demanda y el aporte de nutrientes al feto. Con estas mediciones se esperaría que pudiera detectarse tempranamente el RCIU para establecer medidas terapéuticas o preventivas oportunas.

VII CONCLUSIÓN

En el presente trabajo hemos intentado establecer relaciones y diferencias en las concentraciones de a.a. y la hGH en el líquido amniótico y sangre materna, en embarazos con fetos con crecimiento normal y anormal. Los resultados muestran una elevada consistencia en las proporciones de aminoácidos tanto en el suero materno como en el líquido amniótico que se observa en embarazos complicados con RCIU y en embarazos normales. También se demuestra que a pesar de que hay un gradiente de concentración feto:materno en la concentración de a.a. totales, las proporciones de a.a. individuales se conservan en ambos compartimentos.

En el caso de los embarazos complicados con RCIU es notorio el cambio en el perfil del aminograma, cambio que se manifiesta por un incremento proporcional de los a.a. de cadena ramificada a lo cual acompaña un incremento en la concentración de la hormona del crecimiento. La relación entre la hGH y estos a.a., que se observa desde el inicio de la gestación sugiere que esta hormona es uno, si no es que el único modulador directo de sus concentraciones. En un futuro se recomendaría realizar estudios longitudinales en un intento de establecer si la determinación aislada de alguno de los a.a. en forma aislada, la hGH o bien la combinación de algunos de ellos pudiera ser utilizado como un indicador pronostico del estado de salud fetal.

VIII BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Mathews S. *Biochemistry* 2ª e. Benjamin/Cummings 1996 U.S.A pp 737-780.
- 2.-Creighton T. *Protein structure and molecular principles*. 1ª e. Freeman Corp. 1984 N.Y. U.S.A.
- 3.-Harper. *Química Fisiológica*. 2ª e. Manual Moderno 1980 México.
4. Lenninger A. *Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Omega S.A. 2a e. Barceloma 1981
- 5.-Peña, Arroyo, Gómez, Taia, Villa, *Bioquímica*, Limusa, 1981.
- 6.-Moncada S. Palmer R. Higgs E. *Nitric Oxide Physiology, pathophysiology and pharmacology*. Pharm Rev 1991;43:109.
- 7.-Hata T. Hashimoto M. Manabe A. Aoki S. Iida K. Masumura S. Miyasaki K. *Maternal and fetal nitric oxide stnthesis is decreased in pregnancies with small for gestational age infants*. Hum Rep 1998;13:1070.
- 8.-Abraham W. Philip-Handler E. Smith R. Hill R. *Principios de Bioquímica* 6a e. Mc Graw Hill México 1983
- 9.- Pierce J. *Química de la Materia*. 1a e. Publímex México 1985.
- 10.-Tulchinsky D. Little A. *Maternal-Fetal Endocrinology*. 1994 2ª e. Saunders U.S.A. pp50-60 pp 273
- 11.-Cetin I. Corbetta C. Sereni L. Marconi A. Bozzeti P. Pardi G. Battaglia F. *Umbilical amino acid concentrations in normal and growth retarded fetuses sampled in utero by cordocentesis*. Am J Obstet Gynecol 1990;162:253.
- 12.-Economides D. Nicolaidis K. Gahl W. Bernandini I. Evans M *Plasma amino acids in appropriate and small for gestational age fetuses*. Am J Obstet Gynecol 1989;161:1219.
- 13.- Lindblad B. Baldesten A. *The normal plasma free amino acid levels in non-pregnant women and of mother and child during the delivery*. Acta Ped Scand 1967;56:37
- 14.-Holness M. *Impact of early growth retardation on glucoregulatory control and insulin action in mature rats*. Am J Physiol 1996;270:E946.
- 15.-Simmons M Meschia G. Makowsky E. Battaglia F. *Fetal response to maternal starvation*. Pediatr Res 1974;8:830
- 16.-Dallaire L. Potier M. Melancon S. Patrick J. *Feto-maternal amino acid metabolism*. J Obstet Gynaecol Br Comm. 1974;81:761.
- 17.- Schoengold D. DeFiore R. Parlett R. *Free amino acids in plasma throughout pregnancy*. Am J Obstet Gynecol. 1978;131:490.
- 18.-Harding J.E. *Prior Growth rate determines the fetal growth response to acute maternal undernutrition in fetal sheep of late gestation*. Prenat Neonat Med 1997;2:300.
- 19.-Harding J.E. *Periconceptual nutrition determines the fetal growth response to acute maternal undernutrition in fetal sheep of late gestation*. Prenat Neonat Med. 1997;2:310.
- 20.-Malandro M. Beveridge M. Kilberg M. Novak D. *Effect of low protein induced intrauterine growth retardation on rat placental aminoacid transport*. Am J Physiol 1996;271:C-295.

- 21.-Beckman D. Pugarelli J. *Sources of amino acids for protein synthesis during early organogenesis in the rat. 2 Exchange with amino acids and protein pools in embryo and yolk sac.* Placenta 1991;12:37
- 22.-Rabin O. Lefauconnier JM Chanez C. Bernard G. Bourre JM. *Developmental effects of intrauterine growth retardation on cerebral amino acid transport.* Ped Res 1994;35:640.
- 23.-Lin C.C. Santolaya-Forgas J. *Current concepts of fetal growth restriction: part 1 Causes, clasiffication and pathophysiology.* Obstet Gynecol 1998;92:1044.
- 24.-Gembruch U. Gortner L. *Perinatal aspects of pretermn intrauterine growth restriction.* Ultrasound Obstet Gynecol 1998;11:233.
- 25.-Jauniaux E. Sherwood R. Jurkovic D. Boa F. Campbell S. *Amino acid concentrations in human embryological fluids.* Hum Rep 1994;9:1175.
- 26.-Battaglia F. Thureen P. *Nutrition of the fetus and the premature infant.* Diabetes Care 1998;21:B70.
- 27.-Moghissi K. Churchill J. Kurrie D. *Relationship of maternal amino acids and proteins to fetal growth and mental development.* Am J Obstet Gynecol. 1975;123:398.
- 28.-Aldorreta P. Hay W. *Metabolic substrates for fetal energy metabolism and growth.* Clin Perinatol. 1995;22:15.
- 29.-Gulbis B. Jauniaux E. Jurkovic D. Thiry P. Campbell S. Ooms H. *Determination of protein pattern in embryonic cavities of human early pregnancies: a means to understand materno-embryonic exchanges.* Hum Repr. 1992;7:886.
- 30.-Jauniaux E. Gulbis B. Jurkovic D. Campbell S. Collins W. Ooms H. *Relationship between protein concentrations in embryological fluids and maternal serum and yolk sac size during human early pregnancy.* Hum Rep 1994;9:161.
- 31.-Beckman D. Pugarelli J. *Sources of amino acids for protein synthesis during early organogenesis in the rat. 1 Realitive contributions of free amino acids and proteins.* Placenta 1990;11:111.
- 32.-Beckman D. Brent R. Lloyd J. *Pynocitosis in the rat visceral yolk sac: Potencial role in amino acid nutrition during the fetal period.* Placenta 1994;15:171.
- 33.-Schroeder H. Schoch C. *The artificialy perfused guinea pig yolk sac placenta: transfer and uptake of water glucose and amino acids.* Placenta 1991;12:495.
- 34.-Steengers R. Wathen N. Eskss T. Raaij-Selten B. Chard T. *Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy.* Br J Obstet Gynecol 1997;104:20.
- 35.-Jauniaux E. Gulbis B. Gerlo E. Rodeck C. *Free amino acid distribution inside the first trimester human gestational sac.* Early Hum Dev 1998;51:159.
- 36.-Moe J. *Placental amino acid transport* Am J Physiol 1995;268:1321.
- 37.-Mahendran D. *Amino acid (system A) transporter activity in microvillus membrane vesicles from placentas of appropriate and small for gestational age*

babies. *Ped. Res* 1994;34:661.

38.-Conrad K. Vil M. McGuire P. Dail W. Davis A. *Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi*. *FASEB J*. 1993;7:1269.

39.-Byrne R. Howard R. Morrow R. Whiteley K. Adamson S. *Role of the l-arginine nitric oxide pathway in hypoxic fetoplacental vasoconstriction*. *Placenta* 1997;18:627.

40.-Poranen A. Aubry J. Klujari H. Ekblad U. *Expression of nitric oxide synthase in normal and preeclamptic placental tissue and effects of glyceril trinitrate and shear stress on placental blood flow*. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77:594.

41.-Glazier J. Sibley C. Carter A. *Effect of fetal growth restriction on system A amino acid transporter activity in the maternal facing plasma membrane of rat syncytiotrophoblast*. *Ped Res*. 1996;40:325.

42.-Sibley C. *Placental transport activity and expression in relation to fetal growth*. *Exp Physiol* 1997;81:389.

43.-Leger J. Oury J. Noel M. Baron S. Benali K. Blot P. Czernichow P. *Growth factors and intrauterine growth retardation. I Serum growth hormone, insulin like growth factor (IGF-I), IGF-II and IGF binding proteins 3 levels in normally grown and growth retarded human fetuses during the second half of gestation*. *Ped Res* 1996;40:94.

44.-Leger J. . Noel M. Limal J. Czernichow P. *Growth factors and intrauterine growth retardation. II Serum growth hormone, insuline like growth factor (IGF-I), and IGF binding proteins 3 levels in children with intrauterine growth retardation compared with normal control subjects: Prospective study from birth to two years of age*. *Ped Res* 1996;40:101

45.-Alsat E. Guibourdenche J. Lutton D. Frankenne F. Evain-Brion D. *Human Placental growth hormone*. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1526.

46.-Carr B. *Fetal Placental Unit*. en *Encyclopedia of Reproduction Volume 2* 1999 Academic Press NY USA pp 338.

47.-Alsat E. Marcotty C. Gabriel R. Igout A. Frankenne F. Hehhen G. Evain-Brion D. *Molecular approach to intrauterine growth retardation: an overview of recent data*. *Repr Fert Dev* 1995;7:1457.

48.-Chung M. Teng C. Timmerman M. Meshia G. Battaglia F. *Production and utilization of amino acids by ovine placenta in vivo*. *Am J Physiol* 1998;274 E-13.

49.-Timmerman M. Chung M. Wilkening R. Fennessey P. Battaglia F. Meschia G. *Relationship of fetal alanine and placental alanine metabolism to maternal plasma alanine concentration*. *Am J Physiol* 1998;275:E-942.

50.-Hay William. *The role of placental-fetal interaction in fetal nutrition*. *Sem Perinat* 1991;15:424.

51.-Joswik M. Teng C. Battaglia F. Meschia G. *Fetal supply of amino acids and amino nitrogen after maternal infusion of aminoacids in pregnant sheep*. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:447.

52.-Woods L. Hohimer R. Davis L. *Renal responses to amino acids in the*

- sheep fetus*. Am J Physiol 1996;270:R-1226.
- 53.-Nieto-Diaz A. Villar J. Matorras-Weinig R. Valenzuela-Ruiz P. *Intrauterine growth retardation at term, association between anthropometric and endocrine parameters*. Acta Obstet Gynecol Scand 1996;75:127.
- 54.-Battaglia F. *Fetal Liver and placenta*. in *Placental Function and fetal nutrition*. 1 de. 1997. Lippincot-Raven NY USA. pp 47.
- 55.-Cetin I. Marconi A. Bozzetti P. Sereni L. Corbetta C. Pardi G. Battaglia F. *Umbilical amino acid concentrations in appropriate and small for gestational age infants: a biochemical difference present in utero*. Am J Obstet Gynecol 1988;158:120.
- 56.-Jhonson J. *Protein turnover in rat placenta: effects of maternal fasting and maternal restriction*. Placenta 1992;13:141.
- 57.-McClain P. Metcalf J. Crosby W. Costiloe J. *Relationship of maternal amino acid profiles at 25 weeks of gestation to fetal growth*. Am J Clin Nutr 1978;31:401.
- 58.-Cetin I. Ronzonni S. Marconi A. Ferguino G. Corbetta C. Battaglia F. Pardi G. *Maternal concentrations and fetal maternal concentration differences of plasma amino acids in normal and intrauterine growth- restricted pregnancies*. Am J Obstet Gynecol 1996;174:1575.
- 59.-Pardi G. Cetin I. Marconi A. Lanfranchi A. Bozzetti P. Ferrazi E. Buscaglia M. Battaglia F. *Diagnostic value of blood sampling in fetuses with growth retardation*. NE J Med 1993;328:692.
- 60.-Daffos F. Capella-Pavlosky M. Forestier F. *Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound: A study of 606 consecutive cases*. Am J Obstet Gynecol 1985;153:655.
- 61.-Economides D. *Metabolic and endocrine findings in appropriate and small for gestational age fetuses*. J Perinat Med 1991;19:97.
- 62.-Ross J. Fennessey P. Wilkening R Battaglia F Meschia G. *Placental transport and fetal utilization of leucine in a model of growth retardation*. Am J Physiol. 1996;270:E-491.
- 63.-Toledo-Eppinga L. Houdijk M. Delemarre-Van de Wall H. Jakobs C. Lafeber H. *Leucine and glucose kinetics during growth hormone treatment in intrauterine growth-retarded preterm infants*. A, J Physiol 1996;270:E-451.
- 64.-Neri-I. Mazza V. Galassi M. Volpe A. Facchenetti F. *Effects of L-arginine on utero-placental circulation in growth retarded fetuses*. Act Obstet Gynecol Scand 1996;75:208.
- 65.-Giles W. Falconer J. Read M. Leitch I. *Ovine fetal umbilical artery Doppler systolic diastolic ratios and nitric oxide synthase*. Obstet Gynecol 1997;89:53.
- 66.-Kurjak A. Chevernak F. *The fetus as a patient*. 1994. 1^a e. Partenon London UK. pp 317-359
- 67.-Harman C. *Invasive fetal testing and treatment*. 1995 Blackwell Scientific Publications U.S.A. pp107-193
- 68.-O'neil R. Morrow G. Hammel D. Auerbach V. Barnnes L. *Diagnostic significance of amniotic fluid amino acids*. Obstet Gynecol 1971;37:550.

- 69.-Thomas G. Parmley T. Stevenson R. Howell R. *Developmental changes in amino acid concentrations in human amniotic fluid. Abnormal findings in maternal phenylketonuria* Am J Obstet Gynecol 1971;111:38
- 70.-Gitlin D. Kumate J. Morales C. Noriega L. Arevalo N. *The turnover of amniotic fluid protein in the human conceptus.* Am J Obstet Gynecol 1972;113:632.
- 71.-A'Zary E. Saifer A. Schneck L. *The free amino acids in maternal and fetal extracellular fluids collected during early pregnancy.* Am J Obstet Gynecol. 1973;118:854.
- 72.-Reid D. Campbell D. Yarkymyshyn L. *Quantitative amino acids in amniotic fluid and maternal plasma in early and late pregnancy.* Am J Obstet Gynecol 1971;111:251.
- 73.-Reid D. Campbell D. Yarkymyshyn L. *Amino acid variations in amniotic fluid and maternal plasma from Rh-sensitized pregnancies.* Am J Obstet Gynecol 1972;114:1035.
- 74.-Bernstein I. Silver R. Nair K. Stirwalt W. *Amniotic fluid glycine-valine ratio and neonatal morbidity in fetal growth.* Obstet Gynecol 1997;90:933.
- 75.-Delmis J. *Glucose insulin, HGH and IGF-1 levels in maternal serum, amniotic fluid and umbilical venous serum. A comparison between normal pregnancy and pregnancy complicated with diabetes and fetal growth retardation.* J Perinat Med 1992;20:47.
- 76.-Nogami H. Tachibana T. Ishkawa H. *Intruterine growth retardation due to growth hormone deficiency in rats.* Biol Neonate 1995;68:412.
- 77.-Arosio M. Cortelazzi D. Persani L. Palmieri E. Casati G. Baggiani A. Gambino G. Beck Pecoz P. *Circulation levels of growth hormone, insuline like growth factor-1 and prolactin in normal, growth retarded and anencephalic human fetuses.* J Endocrinol Invest 1995;18:346.
- 78.-Chowen J. Evain-Brion D. Pozo J. Alsat E. Garcia-Segura L Argente J. *Decreased expresion of placental growth hormone in intrauterine growth retardation.* Ped Res 1996;39:736.
- 79.-Arroyo P. Casanueva E. *Peso esperado para talla y edad gestacional, tablas de referencia.* Ginec Obstet Mex 1985;53:227.
- 80.-Phelan JP. SmithCV. Broussara P. Smail M. *Amniotic fluid volume assesment with fou quadrants technique* J Repr Med 1987;32:540.
- 81.-Deter R. Hadlock F. Harrist R. Carpenter R. *Evaluation of three methods for obtaining fetal weight estimates using dynamic image ultrasound.* J Clin Ultr 1981;9:421
- 82.-Hulley S. Cummings S *Diseño de la Investigación clinica. Un enfoque epidemiologico.* Ediciones doyma 1984. 1ª ed.. Barcelona España. pp141.153
- 83.-Dawson-Saunders . *Bioestadística Medica* 1997 2ª e. De. Manual Moderno Mexico pp 174-190
- 84.-Ley D. E. Laurin J. Bjerre I. Marsal K. *Abnormal fetal aortic velocity waveform and minor neurological dysfunction at 7 years of age.* Ultr Obstet Gynecol 1996;8:152.
- 85.- Ley D. Tiderman E. Laurin J. Bjerre Y Marsal K *Abnormal fetal aortic*

waveform and intellectual function at 7 years of age Ultr Obstete Gyneocl
1996;8:160.