



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

13
M

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DETERMINACION DE GLICINA EN LCR Y SUERO
EN NIÑOS CON Y SIN CRISIS CONVULSIVAS, POR
MEDIO DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A ,
BEATRIZ CHAVEZ CALZADILLA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Q.F.B. Isabel Cristina Ibarra González.

Agradezco la ayuda y sugerencias al presente trabajo de los Drs. Marcela Vela y Antonio Velázquez.

A Roberto,

Gracias por tu paciencia por no dejarme vencer para llegar a esta meta que por momentos creí inalcanzable, por estar a mi lado y sobre todo por creer en mí.

A Magarita y Honorio, mis padres, con cariño

A Josefina, Esteban, Guillermo, Pablo y especialmente a Arturo y Gwena, José Antonio y Lety por lo que me han dado.

*Agradezco enormemente las facilidades que me
prestaron en la Unidad de Genética de la Nutrición a
todo el personal por la ayuda y amistad brindada.*

*Y por supuesto a los profesores de la Facultad de
Estudios Superiores Zaragoza, especialmente a la profra.
Martha A. Sánchez Rodríguez por sus comentarios y
sugerencias para este trabajo, y más aún por su apoyo
que recibí durante la carrera.*

Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad. Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra.

T. H. Huxley

Indice

	pág.
1. Resumen	1
2. Marco teórico	2
A. Características bioquímicas de la glicina	2
B. Función neuroquímica de la glicina	4
C. Causas de hiperglicinemia	5
D. Tipos de hiperglicinemia no cetósica.	7
E. Características bioquímicas de la hiperglicinemia no cetósica	9
F. Particularidades del líquido cefalorraquídeo	10
G. Crisis convulsivas	10
H. Fundamentos cromatográficos y análisis de aminoácido	11
3. Planteamiento del problema	14
4. Objetivos	16
5. Hipótesis	17
6. Material	18
6.1. Selección de pacientes	18
6.2. Diseño experimental	18
7. Método	20
7.1. Equipo	20
7.2. Condiciones cromatográficas	20
7.3. Procedimiento	21
7.4. Consideraciones éticas	22
7.5. Análisis estadístico	22
8. Resultados	23
9. Análisis y discusión	31
9.1. Análisis de dos grupos	31
9.2. Análisis individual de los casos extremos.	33
10. Conclusiones	35
10.1. Se recomienda para un estudio posterior	35
11. Bibliografía	36

1. Resumen

Algunas anormalidades en las características bioquímicas del líquido cefalorraquídeo (LCR) se asocian con frecuencia a enfermedades metabólicas hereditarias cerebrales, especialmente en lo que se refiere a la concentración de aminoácidos. Hamosh et al reportan que el cociente de Gli LCR/Gli suero se encuentra por arriba de 0.09 en pacientes con hiperglicinemia no cetósica, pero no hay información sobre la especificidad diagnóstica de este resultado. Por ello decidimos determinar los niveles de glicina en LCR y suero por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). En el presente estudio se analizó la concentración de glicina en LCR y suero así como los cocientes correspondientes de una muestra de 36 niños mexicanos del Instituto Nacional de Pediatría (INP) que por diversas indicaciones médicas fueron sometidos a punción lumbar. Estos pacientes se dividieron en dos grupos: niños con crisis convulsivas y sin crisis convulsivas. En este estudio pudimos observar que en el LCR de los pacientes con neuroinfección y crisis convulsivas, además de las alteraciones ya conocidas, como aumento de proteínas y de la celularidad, también pueden presentar aumento en la concentración de glicina, y que alteraciones como éstas pueden llevar a un cociente anormal y no necesariamente ser diagnóstico de hiperglicinemia no cetósica (HGNC).

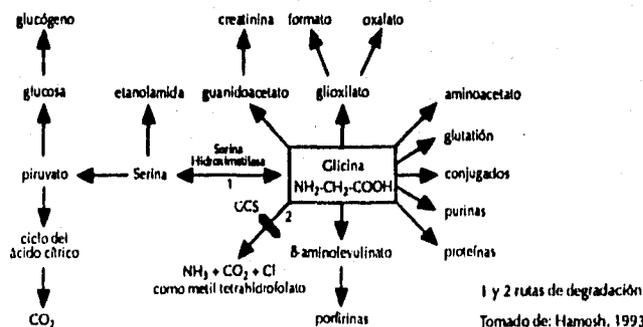
2. Marco teórico

A. Características bioquímicas de la glicina

La glicina es el más pequeño de los aminoácidos, contiene 2 átomos de carbono, un grupo amino y un grupo carboxilo, se forma a partir del dióxido de carbono y del amoniaco por la acción de la glicina sintetasa, enzima dependiente del fosfato de piridoxal. Es un aminoácido no esencial, es decir puede ser sintetizado en el organismo. El consumo promedio de glicina en los adultos es de 3 a 5 gramos al día¹.

El metabolismo de la glicina (Fig. 1) se encuentra relacionado principalmente con procesos de síntesis de gran variedad de moléculas y juega un papel importante en la formación de la mayoría de las proteínas animales tales como la colágena, facilitando la estructura helicoidal de la misma en la que se encuentra en altas concentraciones. Aproximadamente 50% de la glicina ingerida por la dieta se usa en la síntesis de proteínas, cerca del 10% se encuentra en el cuerpo como nitrógeno no protéico, 40% se excreta directamente en la orina y 2 a 3% se excreta en las heces². La glicina también juega un papel importante en la síntesis de purinas.

Fig. 1
Ruta Metabólica de la Glicina



La glicina posee dos rutas de degradación. Una es mediante su conversión a serina por la adición enzimática del grupo hidroximetil (Fig.2). Esta reacción es catalizada por la serina hidroximetil transferasa, que requiere dos coenzimas, tetrahidrofolato y fosfato de piridoxal. La segunda ruta de degradación, involucra una ruptura oxidativa a CO_2 , NH_4^+ y un grupo metileno (Fig. 2). Esta reacción fácilmente reversible es catalizada por un complejo enzimático de cuatro proteínas localizadas dentro de la membrana mitocondrial del hígado, riñón, cerebro y placenta; proteína P (fosfato de piridoxal), Proteína H (una ácido lipólfico), proteína T (un tetrahidrofolato) y proteína L (lipoamida deshidrogenasa) denominado sistema de ruptura de glicina (GCS siglas en inglés). En esta ruta de degradación oxidativa los dos átomos de carbono de la glicina no entran al ciclo del ácido cítrico. Uno se pierde como CO_2 y el otro es el metileno del grupo $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metilentetrahidrofolato³.

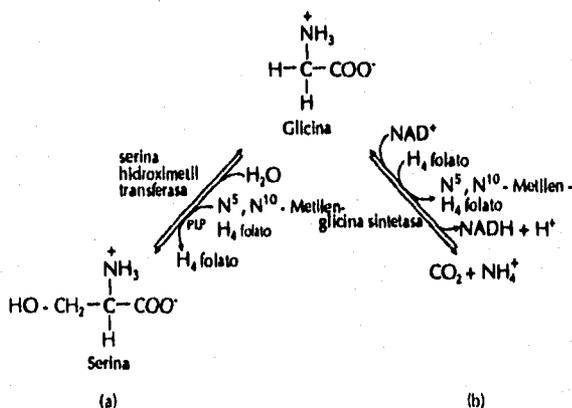


Fig 2. Rutas catabólicas de la glicina.

Tomado de: Lehninger, 1993.

En la ruptura de la glicina la proteína P y la proteína H contribuyen a la etapa inicial de descarboxilación. La glicina forma una base de Schiff con el fosfato de piridoxal de la proteína P, el disulfuro de la proteína H

se combina con este complejo libera CO₂ del grupo carboxilo de la glicina. Este paso está acoplado con la reducción del grupo disulfido de la proteína H y la unión inmediatamente al α-carbón de la glicina para formar un enlace S-C sin la pérdida del átomo de hidrógeno contiguo al α-carbono. Este intermediario es entonces descompuesto por la proteína T en presencia de THF (tetrahidrofolato) para producir metilen-THF y amonio. El dithiol de la proteína H es reoxidado a disulfido por la proteína L y NAD⁺ (Fig. 3)⁴.

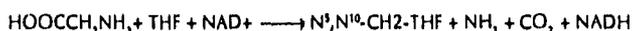


Fig. 3. Reacción catalizada por el GCS.

B. Función neuroquímica de la glicina

En la transmisión sináptica en el cerebro participan varios aminoácidos como el glutamato, ácido gamma aminobutírico y glicina como neurotransmisores. Evidencias recientes sugieren que la glicina juega un importante papel en la neurotransmisión, siendo predominantemente inhibitoria en la médula espinal y excitatoria en la corteza cerebral y otras regiones del encéfalo^{5,6,7}.

La glicina actúa en neuroreceptores específicos. Se ha postulado que la inhibición crónica de la glicina a nivel cerebral causa una excitación neuronal excesiva como resultado de la disminución del control inhibitorio y un aumento en el número de receptores de glicina,⁸ la droga estriquina, un antagonista específico del receptor de inhibición de la glicina, ha sido usado para marcar receptores en el sistema nervioso central de animales y humanos⁶. Se ha medido la unión de la estriquina marcada en la membrana sináptica y se encontró que el número de receptores sinápticos de glicina y la actividad de

desdoblamiento de la glicina tiene un desarrollo paralelo durante el periodo postnatal en ratas. Esto sugiere un posible papel de la enzima de desdoblamiento en la sinapsis glicinérgica, tal vez regulando las concentraciones de la glicina⁹.

Se ha postulado que altas concentraciones de glicina pueden inducir una función anormal de sinapsis glicinérgica interfiriendo con los procesos de estabilización. Mediante estudios electrofisiológicos en cultivos de médula espinal de ratón se mostró una respuesta inhibitoria a glicina. Cuando se estudiaron neuronas en presencia de glicina el efecto que se encontró fue una disminución en la inhibición de glicina. Este efecto en la disminución de la inhibición de glicina podría explicar como niveles excesivos de glicina en fluidos extracelulares en el sistema nervioso central de pacientes con hiperglicinemia no cetósica (HGNC) causan una hiperexcitabilidad, características y cambios en el tono muscular. En modelos experimentales de hiperglicinemia se ha observado que niveles altos de glicina en el sistema nervioso central inducen una hiperactividad del sistema de neurotransmisión de la glicina.

La función de la glicina como principal transmisor inhibitorio en la médula espinal y la base del cerebro puede aumentar en HGNC, produciendo hipertonia, supresión de respiración, oftalmoplejia intermitente e hipotonia¹⁰.

C. Causas de hiperglicinemia

Algunas enfermedades, especialmente de tipo neurológico, se asocian con hiperglicinemia e hiperglicinuria (Cuadro 1). Esto es importante para poder efectuar un diagnóstico diferencial y una terapia correctas. En 1961 se describió al primer paciente con hiperglicinemia cetósica a quién más tarde se demostró que tenía acidemia propiónica, el paciente

presentaba acidosis metabólica, cetosis, neutropenia intermitente, trombocitopenia y retraso mental. Otras enfermedades que presentan características similares son: la acidemia metilmalónica, acidemia isovalérica, y deficiencia de β -cetotiolasa. Pacientes con algunas acidemias orgánicas debido a defectos en las rutas metabólicas de los aminoácidos desarrollan hiperglicinemia como un proceso secundario. Los ácidos orgánicos interfieren con el sistema de desdoblamiento de la glicina en el hígado. El contenido de glicina en LCR y cerebro son normales en estas enfermedades lo cual es distinguible de los pacientes con HGNC. Por otro lado, una de las causas más comunes de hiperglicinuria es la administración del anticonvulsivo valproato (dipropil acetato de sodio). El valproato reduce el sistema de desdoblamiento de glicina, presumiblemente por interferencia con la síntesis de enzimas. El diagnóstico de HGNC no puede ser establecido cuando se tiene una terapia de valproato^{11,12}.

La excreción urinaria de glicina está incrementada en niños recién nacidos y particularmente en niños prematuros porque su sistema de transporte renal de glicina aún no está totalmente desarrollado. La glicina urinaria también está elevada en pacientes con iminoglicinuria familiar e hiperprolinemia tipo I y II.

La actividad de la serina hidroximetilasa y la serina deshidratasa se encuentran normales en hígado de pacientes hiperglicinéicos, contrariamente al sistema de degradación de la glicina el cual se encontró marcadamente disminuido en el hígado de pacientes con hiperglicinemia. Se encontró después un defecto en el sistema de degradación de la glicina en el hígado de pacientes con HGNC¹³.

Para establecer el diagnóstico de HGNC es esencial determinar aminoácidos en suero así como en LCR y calcular el cociente LCR/suero así como analizar los ácidos orgánicos urinarios por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Hiperglicinemia	No cetósica	Hiperglicinemia no cetósica
		Terapia con Valproato
		Acidemia D-glicérica
	Cetósica	Acidemia metil malónica
		Acidemia propiónica
		Acidemia Isovalérica
		Deficiencia de β -cetotilasa
	Hiperglicinuria	Benigna (sistema de reabsorción de glicina inmaduro)
		Iminoglicinuria familiar
		Hiperprolinemia tipo I (iminoglicinuria)
Hiperprolinemia tipo II (iminoglicinuria)		
Hiperprolinemia no cetósica		

Cuadro 1. Diagnóstico diferencial de hiperglicinemia.

D. Tipos de hiperglicinemia no cetósica.

Así como otros errores innatos del metabolismo, la hiperglicinemia no cetósica tiene un amplio espectro de fenotipos clínicos. Han sido descritos tres fenotipos diferentes: neonatal, de comienzo tardío y transitoria.

Hiperglicinemia no cetósica neonatal

La mayoría de los casos caen dentro de este fenotipo. Los pacientes desarrollan letargia, hipotonía profunda y se rehusan a comer. Los estudios de rutina de laboratorio de niños con HGNC son

marcadamente normales, aunque producen severas anormalidades neurológicas. Los parámetros hematológicos son normales, no tienen anemia, leucopenia o trombocitopenia. Los niveles de electrolitos son normales sin evidencia de acidosis metabólica. Los ácidos orgánicos urinarios son normales. La anormalidad consiste en la elevación de la concentración de glicina en orina, plasma y líquido cefalorraquídeo. Se han reportado dos casos los cuales presentan una acidosis metabólica importante como la que se observa en acidemia metilmalónica o acidemia propiónica, pero los ácidos orgánicos urinarios son normales^{14,15}.

La concentración de glicina en plasma en pacientes con HGNC están elevados de 1 a 4 veces por arriba de los valores normales. La concentración de glicina en orina es usualmente alta aunque es difícil su interpretación porque usualmente la hiperglicinuria es característica de los recién nacidos; por esta razón esta determinación no es diagnóstica en los pacientes con HGNC. Las concentraciones en líquido cefalorraquídeo están elevadas de 15 a 30 veces de lo normal, mucho mayor que la concentración de glicina en suero, de aquí que los valores de la relación Gli LCR/Gli suero sean altos. Un valor >0.09 en la relación Gli LCR/Gli suero es considerado como diagnóstico de HGNC. Un diagnóstico definitivo se puede establecer determinando el sistema de degradación de la glicina pero se requiere de una biopsia de hígado lo cual no es muy factible en un neonato^{16,17,18}

Hiperglicinemia no cetósica de inicio tardío

En estos pacientes, la relación LCR/suero es elevada pero no presentan enfermedad en el período neonatal, sino en edades posteriores. Suelen tener un desarrollo normal hasta los 6 meses de edad^{18,19,20}. Estos pacientes son similares a aquellos con HGNC neonatal, pero no presentan apnea profunda e hipotonía que son características de la HGNC neonatal, y suelen sobrevivir, además, el retraso mental es menos grave^{20,21}.

Hiperglicinemia no cetósica transitoria

Estos pacientes son clínicamente indistinguibles de los pacientes con HGNC neonatal pues la relación Gli LCR/Gli suero es elevada, dentro de las 2 a 8 semanas de vida estos niveles vuelven a su nivel normal. La etiología de la HGNC transitoria se puede relacionar a que no ha madurado completamente el sistema de degradación de la glicina en el hígado y el cerebro^{22,23,24}.

E. Características bioquímicas de la hiperglicinemia no cetósica

El metabolismo de la glicina en el sistema nervioso central depende de la actividad del sistema de degradación de glicina. Parece que hay una correlación entre la concentración de glicina del LCR y el fenotipo clínico, entre más alto sea la concentración de glicina en LCR es más severa la enfermedad. Existe una fuerte correlación entre el cociente Gli LCR/Gli suero. Un cociente normal consiste en un valor menor a 0.02, pacientes con HGNC atípica tienen un cociente Gli LCR/Gli suero alrededor de 0.09^{25,26}. (Tabla 2)

Hasta el momento se desconoce la ubicación cromosómica del defecto, sin embargo se sabe que se encuentra a nivel del sistema degradador o de ruptura de la glicina, ya demostrado por Tada²⁷. Este sistema enzimático de la glicina está formado por cuatro proteínas denominadas P, H, T y L. Se ha observado que la mayoría de los casos de hiperglicinemia no cetósica corresponden a defectos en la proteína P.

	Recién nacidos	HGNC Neonatal	HGNC Atípica
Plasma	56-308*	920-1827*	447-793*
LCR	2.9-10.4*	83-280*	42-72*
LCR/Suero	0.012-0.040**	0.09-0.25**	0.094-0.097*

Tabla 2 Concentraciones de glicina en suero y líquido cefalorraquídeo (μM)

* Dato tomado de Hayasaka et al.

** Dato tomado de Tada y Hayasaka.

F. Particularidades del líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo es un fluido que circula en el espacio subaracnoideo y posee importantes funciones entre las cuales está el proteger al cerebro y la médula espinal de lesiones, así como transportar productos de secreción nerviosa, biosíntesis y metabolismo celulares.

El líquido cefalorraquídeo llena los ventrículos y el espacio subaracnoideo del cerebro y médula espinal. En el hombre su volumen es aproximadamente 140 ml y se secreta a una velocidad de 0.5 ml por minuto. El recambio de este fluido es muy alto, calculándose que en un día cambia 4 ó 5 veces. La presión del líquido cefalorraquídeo es menor de 110 mmH₂O en los recién nacidos y menor de 200 mmH₂O en lactantes y niños mayores²⁹.

El líquido cefalorraquídeo se forma por la secreción coroidea y por grandes cantidades de agua y sustancias disueltas que llegan por medio del mecanismo de ósmosis. Así mismo hay difusión continua entre el líquido cefalorraquídeo y la sustancia cerebral debido a que existen grandes superficies de contacto por debajo del epéndimo y de la difusión a partir de los vasos sanguíneos de las meninges.

Es debido a estos dos mecanismos, difusión y filtración, que las características de este líquido son semejantes a las del líquido extracelular del cerebro y su composición es representativa del tipo e intensidad del metabolismo que es llevado a cabo a nivel cerebral³⁰.

G. Crisis convulsivas

Las crisis convulsivas son eventos de frecuente presentación en la edad pediátrica. Se estima que ocurren de 4 a 6 casos por cada 1000 niños.

Son manifestaciones de procesos subyacentes que afectan al sistema nervioso central y que requieren de una investigación exhaustiva, sin embargo en la mayor parte de los casos no puede determinarse la etiología de las crisis. Existe una gran variedad de tipos de crisis convulsivas y se han clasificado principalmente en generalizadas y parciales. Las generalizadas se dividen a su vez en tónicas, clónicas, tónico-clónicas, ausencias, atónicas y espasmos. Las crisis convulsivas parciales se dividen en simples y complejas. Las características de las crisis convulsivas son importantes y hay que tomar en cuenta para la orientación diagnóstica todos los factores asociados por ejemplo: la duración, los factores desencadenantes, la presencia de aurea, de período postictal, anomalías en el desarrollo psicomotor y antecedentes heredofamiliares^{31,32}. En la edad neonatal las características son diferentes debido a la inmadurez a nivel del sistema nervioso central y suelen presentarse bajo la forma de chupeteo, parpadeo y apneas. Existen una amplia gama de causas que conducen a crisis convulsivas y no hay que perder de vista la posibilidad de una enfermedad metabólica como probable etiología, sobre todo en pacientes que convulsionan sin causa aparente o después de haber descartado las causas más frecuentes para las edades, como son fiebre, traumatismos, procesos infecciosos del sistema nervioso central, hipoxia, alteraciones metabólicas de glucosa, sodio, potasio, bilirrubinas, calcio y magnesio. Los errores innatos del metabolismo de los aminoácidos tales como fenilcetonuria, la enfermedad de orina de jarabe de maple, la hiperglicinemia y las acidemias orgánicas se pueden manifestar como crisis convulsivas neonatales, generalmente desde el segundo día de vida³³.

H. Fundamentos cromatográficos y análisis de aminoácidos^{34,35,36,37}

La cromatografía es una técnica que abarca un grupo variado e importante de métodos que permiten separar, aislar, identificar y

cuantificar componentes presentes en mezclas provenientes de diferentes matrices. Todos los sistemas cromatográficos constan de una fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria. Los componentes de la muestra sufren un equilibrio de distribución entre dichas fases y este equilibrio determina la velocidad con la que los componentes migran a través del sistema. La fase estacionaria puede ser un líquido inmovilizado en un soporte inerte o un sólido, mientras que la fase móvil puede ser un gas y por esto, esta técnica se denomina cromatografía de gases, o un líquido y de aquí, es llamada cromatografía de líquidos. Las fuerzas físicas y químicas que actúan entre el soluto y las dos fases son responsables de la retención del soluto, la diferencia de magnitud de estas fuerzas determina la resolución y por lo tanto la separación de cada soluto.

La cromatografía de líquidos permite el análisis de compuestos líquidos y sólidos de muy variada naturaleza: orgánicos e inorgánicos, iónicos y covalentes, no está limitada por la volatilidad de la muestra ni por su estabilidad térmica (como es el caso de la cromatografía de gases) por lo que resulta idónea para la separación de macromoléculas y especies de interés biomédico, productos de naturaleza lábil y una amplia variedad de otros compuestos de alto peso molecular y/o menos estables entre los que se encuentran proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, polisacáridos, algunos fármacos, vitaminas, etc.

El análisis de aminoácidos ha asumido un papel central en muchos campos de la investigación científica durante las pasadas tres décadas y virtualmente todas las técnicas cromatográficas han sido empleadas para este propósito. La habilidad de la cromatografía líquida de alta resolución de separar rápidamente mezclas de matrices complejas, ofrece una tecnología que puede adaptarse al análisis de aminoácidos. Debido a que existe un gran número de posibles aplicaciones del análisis de aminoácidos, es claro que no todas las técnicas cromatográficas disponibles se pueden ajustar a todas las demandas.

Cualquiera que pueda elegirse, exhibe particulares ventajas y desventajas.

Los fluidos biológicos como la orina, sangre y LCR contienen una variedad de aminoácidos, una vez resuelto, el perfil de aminoácidos provee información clínica del estado metabólico del individuo, errores innatos del metabolismo de aminoácidos han sido diagnosticados mediante la obtención de estos perfiles.

3. Planteamiento del problema

En el Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud (SS) al LCR se le realizan en forma rutinaria exámenes citoquímicos y cultivos bacteriológicos pero no cuantificación de aminoácidos. Se sabe que en diversos padecimientos neurológicos la concentración de éstos se ve modificada, por ejemplo, existen algunos factores que elevan la concentración de glicina en LCR, tales como enfermedades de tipo genético (como hiperglicemia no cetótica), el uso de anticonvulsivos como el ácido valproico,^{12,38} pero ignoramos que efecto pueden tener sobre la misma eventos neurológicos como crisis convulsivas o neuroinfecciones.

En la UGN se realizan determinaciones de aminoácidos en fluidos biológicos mediante CLAR desde 1990 y ha llamado especialmente la atención el comportamiento que en algunas ocasiones se ha observado con respecto a la concentración de glicina, principalmente en LCR la cual suele estar elevada. Sin embargo, los niveles que consideramos como normales, son los que se encuentran descritos en la literatura y todos se refieren a poblaciones extranjeras, no existe reporte de valores de glicina ni de ningún otro aminoácido referidos a la población mexicana de niños sanos ni en aquellos que padezcan problemas que involucren el sistema nervioso central.

El motivo principal por el cual se realiza cuantificación de glicina en LCR es por sospecha de HGNC, puesto que existe un cociente que es característico de dicha enfermedad, pero no hay información sobre la especificidad diagnóstica de este resultado.

La interpretación inadecuada o incorrecta de los niveles de glicina en LCR puede llevar a errores diagnósticos que tengan implicaciones serias para el paciente y su familia.

Por todo lo anterior consideramos de suma importancia conocer el comportamiento de los niveles de glicina en el LCR y suero, así como del cociente Gli LCR/Gli suero en un población de pacientes pediátricos con y sin crisis convulsivas, con objeto de conocer si otros eventos pueden estar involucrados en la concentración anormalmente alta del LCR.

4. Objetivos

- I. Cuantificar los niveles de glicina en el LCR y suero de una muestra de pacientes pediátricos del INP que por diversas indicaciones médicas sean sometidos a punción lumbar, divididos en dos grupos uno con crisis convulsivas y otro sin éstas.**
- II. Determinar si existe relación entre la presencia de crisis convulsivas y el nivel de glicina.**
- III. Relacionar los niveles de glicina con algunos parámetros citoquímicos del LCR**

5. Hipótesis

- I. Los niveles de glicina en líquido cefalorraquídeo son diferentes estadísticamente en los niños que presentan crisis convulsivas que en los que no las presentan.**
- II. Existe una relación entre los niveles elevados de glicina y la presencia de crisis convulsivas.**
- III. La elevación del cociente Gli LCR/Gli Suero es patonómico de HGNC.**

6. Material

Este protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación y Ética del INP.

6.1. Selección de pacientes

Pacientes que ingresan al servicio de urgencias y que se les realiza punción lumbar por alguna indicación médica.

Criterios de inclusión

Niños (sexo indistinto) que sean sometidos a punción lumbar por alguna indicación médica en el servicio de urgencias del INP.

Hoja completa de concentraciones de datos. (Anexo 1)

Criterios de exclusión

Punción lumbar traumática (Macroscópica)

Hoja de concentración de datos incompleta.

Criterios de eliminación

Punción lumbar traumática (Microscópica)

6.2. Diseño experimental

A todos los niños que cumplieron los criterios de inclusión y que se les realizó punción lumbar por indicación médica, se les tomó 1.5 mL de LCR, adicional del que se toma habitualmente para fines de realizar análisis citoquímico y cultivo. También se tomó una muestra de 1 mL de sangre, adicional de la que se toma para exámenes de rutina. Los líquidos para citoquímico y cultivo se procesaron en forma rutinaria.

La muestra de 1.5 mL del LCR se almacenó en un vial de 2 ml a una temperatura de -20°C hasta su procesamiento.

La muestra de 1 mL de sangre se centrifugó y se separó para obtener suero, el cual se almacenó en viales plásticos de 1.5 mL para su almacenamiento en congelación y su procesamiento posterior. Se llenó la hoja de concentración de datos en forma completa para poder realizar el análisis posterior.

A las muestras (tanto de LCR y suero) se les procesó mediante la técnica de CLAR utilizando la metodología y condiciones descritas posteriormente.

Análisis e interpretación de datos. Se obtendrán las concentraciones de glicina en LCR y suero en μM . Se realizará análisis de variables con obtención de medidas de tendencia central y dispersión. Se hará correlación entre las variables y los niveles de glicina.

7. Método

Las concentraciones de la glicina fueron determinadas por CLAR método descrito por Hill et al.³³ modificado.

7.1. Equipo

Cromatógrafo de líquidos Waters, constituido por un controlador automático de gradiente (modelo 680), dos bombas (modelo 510), integrador (modelo 740), e inyector Rheodyne (modelo 7010).

La detección se realizó por medio de un detector de fluorescencia (modelo 420), longitud de onda de excitación de 338 nm, longitud de onda de emisión 425 nm.

7.2. Condiciones cromatográficas

Columna

C-18 Nova-pack (Millipore) de 15 cm x 3.9 mm, tamaño de partícula 4 μ esférica. El corrimiento cromatográfico se realiza a temperatura ambiente.

Sistema de gradiente empleado

Tiempo (min)	Disolventes		Flujo (mL/min)
	%A	%B	
0	83	17	1.3
35	45	55	1.3
50	10	90	1.3

Disolventes

A: Amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7, más 4% de tetrahidrofurano (Baxter) filtrado a través de membrana de 0.45 μ (Millipore).

B: Amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7, acetonitrilo, filtrado a través de membrana de 0.45 μ (Millipore).

Orto-ftaldehído (OPA) - Etanotiol: El reactivo derivatizante contiene: 20 mg de OPA (Sigma) y 10 μ l de etanotiol (Fisher) en 1 ml de metanol (Baxter).

Solución de boratos

Solución saturada de boratos pH básico.

El análisis cuantitativo se realizó con el método de estándar interno (Sti) para lo cual se utilizó una disolución de fluoro-fenilalanina en metanol de concentración 4.6 μ M para LCR y 18.5 μ M para suero.

7.3. Procedimiento

muestra* + 1 ml de metanol (conteniendo el Sti.) \rightarrow centrifugar 5 min (3000 rpm) \rightarrow 100 μ l de sobrenadante + 20 μ l de amortiguador de boratos + 20 μ l de derivatizante

* 50 μ l si se trata de suero y 100 μ l si es LCR.

Después de dos minutos se realizó el análisis de los aminoácidos derivados de OPA por CLAR, inyectando 20 μ l bajo las condiciones anteriormente señaladas.

7.4. Consideraciones éticas

Previo a la inclusión del paciente al protocolo, se solicitó el consentimiento a los padres.

Este estudio no implicó riesgo *per se*, únicamente implicó la toma de 2 mL extras de LCR en un procedimiento indicado por razones médicas. Así mismo se les hizo saber que no implicaba beneficio clínico directo para el paciente sino que los resultados serían útiles como conocimiento de la bioquímica del LCR y servirán de base para estudio posteriores.

7.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en una computadora personal (marca SyncMaster procesador 386) utilizando un paquete estadístico para investigación biomédica (Sigma Plot 210)

El tamaño de la muestra, se calculó para *t* pareada, con una alfa de 0.05 y una beta de 0.90, tomando los valores de glicina en LCR, obtenidos en una muestra de 30 niños hospitalizados, dividida en dos grupos y considerando una pérdida de 10%.

La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba de *U* de Mann-Whitney que es para datos no paramétricos. El criterio de aceptación es que el valor de probabilidad sea menor a 0.05. Para buscar posibles correlaciones entre la concentración de glicina en LCR y otros parámetros estudiados se realizó una prueba exacta de Fisher

8. Resultados

Este estudio se realizó con 36 pacientes a los que por prescripción médica se les practicó una punción lumbar. Las causas de la punción lumbar fueron: sospecha de neuroinfección en 29 de los casos, primera crisis convulsiva en 5, y otras como ataxia en 2 casos. A estos pacientes se les dividió en dos grupos: pacientes con crisis convulsivas (n=19) y pacientes sin crisis convulsivas (n=17).

La edad de los pacientes en el grupo con crisis convulsivas fue de 29 ± 36.5 meses, con una mediana de 20 y un intervalo de 0.76-132 meses. En el grupo sin crisis convulsivas fue de 24 ± 28.6 meses, con una mediana de 12 y un intervalo de 1-96 meses. No existe diferencia estadísticamente significativa entre las edades de ambos grupos.

El sexo de los pacientes en el grupo con crisis convulsivas fue 9 femeninos y 10 masculinos. En el grupo sin crisis convulsivas, fue 7 femeninos y 10 masculinos.

En las tablas 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos de los pacientes con crisis y sin crisis convulsivas respectivamente.

Los valores de referencia de la concentración de glicina tanto en suero como en LCR así como en cociente se obtuvieron a partir de los datos de la muestra estudiada, eliminando aquellos que en la gráfica eran visiblemente más elevados. Estos datos siguen una distribución normal, están dados por la media ± 2 desviaciones estándar (D.S), lo que corresponde al 95% de la población (Tabla 6).

La concentración de glicina en el grupo de crisis convulsivas en el LCR fue de $30.01 \pm 29.52 \mu\text{M}$, en suero fue de $197.93 \pm 53.69 \mu\text{M}$, y el cociente fue de $0.151 \pm 0.132 \mu\text{M}$.

Cabe destacar que algunas características del LCR están alteradas, la concentración de proteínas, en tres de los pacientes (B,K,T) están por arriba de lo normal.

La celularidad del LCR fue anormal en tres casos (K,P,T).

Los valores de glicina en LCR se encontraron alterados en 5 pacientes. El paciente D presentó valor limítrofe superior, (Gráfica 1) el paciente E presentó una elevación de casi al doble del valor superior normal, en el paciente K fue de 3 veces. La elevación máxima observada en este grupo de pacientes fue de 4 veces por arriba de lo normal en dos casos (P,T).

Todos los valores de glicina en suero en este grupo fueron normales.

Con respecto al cociente se encontraron 5 pacientes francamente anormales (D,E,K,PT); todos ellos con aumento de glicina en LCR (Gráfica 3).

La concentración de glicina en el grupo de pacientes sin crisis convulsivas en el LCR fue de $20.49 \pm 13.03 \mu\text{M}$, en suero fue de $224.06 \pm 87.68 \mu\text{M}$ y el cociente en este grupo fue de $.09 \pm 0.060 \mu\text{M}$.

En estos pacientes podemos apreciar que la concentración de proteínas en cuatro de los pacientes ($\alpha, \delta, \eta, \nu$) están por arriba de lo normal. Con respecto a la celularidad del LCR, estuvo alterada en tres pacientes (ρ, π, δ).

Los valores de glicina en LCR se encontraron alterados en 2 pacientes, de los cuales el paciente b mostró una elevación de dos veces por arriba del valor superior normal, y el paciente g la elevación fue sólo de una vez (Gráfica 1).

Tabla 1. Grupo con crisis convulsivas

Clave	Edad (meses)	Sexo	Motivo de PL	Aspecto de LCR	Película	Proteínas	No. de	Leucocitos	Gli-	Cociente Gli	
						(mg/100ml)	células		LCR		Gli-suero
						15-45			5-26		
VR						(mg/100ml)	0-20		µM	µM	0.03 - 0.12
A	0.76	F	CC	AR	sin	29.8	4	0	23.36	197.57	0.118
B	2	M	CC	AR	sin	17.9	2	0	21.20	191.98	0.110
C	4	M	CC	AR	sin	16.5	1	0	7.75	143.50	0.054
D	4	M	NI CC	AR	sin	12	7	0	32.13	119.85	0.268
E	5	M	NI CC	AR	sin	13.6	1	0	47.80	136.44	0.350
F	5	F	NI CC	AR	sin	21	5	0	11	188.60	0.058
G	6	M	NI CC	AR	sin	14	1	0	17.05	158.50	0.108
H	8	M	NI CC	AR	sin	15.2	2	0	11.60	187.51	0.062
I	9	F	CC	AR	sin	21	1	0	9.59	140.27	0.068
J	20	M	NI CC	AR	sin	11	2	0	23.99	247.91	0.097
K	20	F	NI CC	Turbio	Presente	230.6	incontables	PMN 100%	62.32	229.80	0.358
L	24	F	NI CC	AR	sin	17	2	0	10.46	161.16	0.065
M	24	F	NI CC	AR	sin	21	0	0	14.45	255.53	0.057
N	26	F	CC	AR	sin	11.8	-	0	12.46	319.18	0.039
P	35	M	NI CC	AR	sin	36.8	24	0	93.17	225.75	0.413
Q	48	F	NI CC	AR	sin	9.7	4	0	17.40	221.90	0.078
R	84	M	NI CC	AR	sin	17	2	0	9.01	133.87	0.067
S	96	M	NI CC	AR	sin	30	1	0	23.88	254.24	0.094
T	132	F	NI CC	AR	sin	173.1	7	87% LIN 13% PMN	101.7	247.27	0.411

PL = Punción lumbar
NI = Neuroinfección

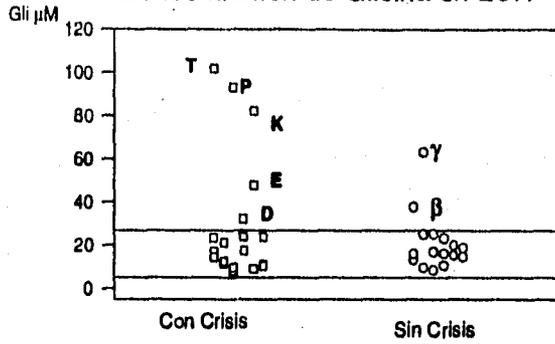
AR = Agua de roca
VR = Valor de referencia

Tabla 1. Grupo sin crisis convulsivas

Clave	Edad (meses)	Sexo	Motivo de PL	Aspecto de LCR	Película	Proteínas	No. de	Leucocitos	Gli-		Cociente Gli LCR/suero
						(mg/100ml)	células		LCR	Gli-suero	
V R						15-45 (mg/100ml)	0-20		5-26 μ M	64-358 μ M	0.03 - 0.12
α	1	M	NI	AR	Sin	47.7	5	0	13.33	177.13	0.075
β	1	F	otra	AR	Sin	38.4	1	0	63.14	319.93	0.197
χ	3	F	NI	AR	Sin	43.7	4	0	25.08	450.85	0.056
δ	5	M	NI	AR	Sin	102.6	202	60% LIN 40% PMN	16.09	83.17	0.193
ϵ	5	F	NI	AR	Sin	36	2	0	15.33	168.52	0.091
ϕ	6	M	NI	AR	Sin	17.4	3	0	18.69	283.45	0.066
γ	6	M	NI	AR	Sin	12.5	0	0	37.68	161.08	0.234
η	8	M	NI	AR	Sin	84.2	0	0	9.58	199.83	0.048
ι	12	M	NI	AR	Sin	16	0	0	8.46	208.03	0.041
φ	12	M	NI	AR	Sin	-	0	0	23.18	242.27	0.096
κ	15	F	NI	AR	Sin	10.2	0	0	19.85	251.12	0.079
λ	17	F	otra	AR	Sin	32	0	0	14.54	151.81	0.096
μ	45	M	NI	AR	Sin	19	1	0	15.93	150.73	0.106
ν	46	F	NI	AR	Sin	81	0	0	24.86	312.33	0.080
π	60	F	NI	AR	Sin	30.9	40	80% LIN 20% PMN	16.80	174.64	0.096
θ	71	M	NI	AR	Sin	13.7	0	0	10.64	294.99	0.036
ρ	96	M	NI	AR	Sin	44	35	98% LIN 2% PMN	15.29	179.28	0.085

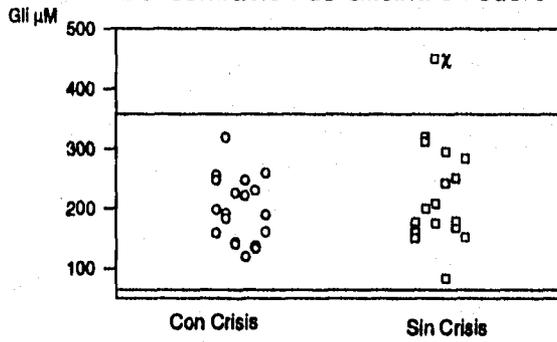
PL = Punción lumbar
 NI = Neuroinfección
 AR = Agua de roca

Concentración de Glicina en LCR



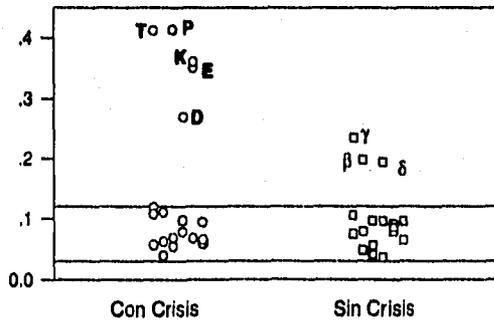
Gráfica 1

Concentración de Glicina en suero



Gráfica 2

Cociente Gli LCR/Gli suero



Gráfica 3

Los valores de glicina en suero en este grupo fueron normales en todos los pacientes excepto en el caso χ que presentó una ligera elevación (Gráfica 2).

Por lo que se refiere al cociente se encontraron tres pacientes (β, δ, γ) con un valor mayor de 0.12, 2 de ellos (β, γ) con glicina elevada en LCR en tanto que en el paciente δ este cociente fue elevado a expensas de una concentración baja en suero, siendo normal la concentración en LCR.

En la gráfica 1 y 2 se muestran las concentraciones de glicina de los dos grupos estudiados de LCR y suero respectivamente.

En la gráfica 3 se observan los valores de los cocientes de los grupos estudiados.

En la tabla 3 se muestran los valores de p (prueba estadística U de Mann-Whitney Rank), para los parámetros de glicina evaluados.

Variable	Grupo con crisis	Grupo sin crisis	p
n	19	17	
GLI en LCR	30.01	20.49	0.776
GLI en Suero	197.93	224.06	0.410
LCR/Suero	0.151	0.092	0.267

Tabla 3. Análisis de los parámetros de glicina de los grupos estudiados.

p = prueba estadística de Mann-Whitney

Al no encontrarse significancia estadística entre estos grupos se decidió analizar en función de dos nuevos grupos dados por la concentración de glicina en LCR lo cual se muestra en la tabla 4.

Variable	Pacientes normales	Pacientes anormales	p
	de LCR	de LCR	
n	29	7	
GLI en LCR	15.89	65.42	<0.001 *
GLI en Suero	211.37	205.83	0.873
LCR/Suero	0.076	0.251	0.035
Células	11.53	21.6	0.422
Proteínas	35.51	73.71	0.665

Tabla 4. Análisis de los parámetros de grupos normales y anormales de líquido cefalorraquídeo.
p = prueba estadística U de Mann-Whitney

* = Existe diferencia significativa

Se realizaron tablas de contingencia de 2 X 2 por prueba exacta de Fisher con objeto de saber si existía asociación entre la concentración de glicina en LCR y otros factores.

Factor	Glicina en LCR		p
	Normal	Anormal	
Convulsiones			
Con	14	15	0.462
Sin	5	2	
Suero			
Normal	28	7	> 0.999
Anormal	1	0	
Proteínas			
Normal	22	5	0.010
Anormal	6	2	
No. de Células			
Normal	26	4	0.073
Anormal	3	3	
Sexo			
Femenino	13	3	> 0.999
Masculino	16	4	

Tabla 5 Análisis de relación entre glicina en líquido cefalorraquídeo y otros parámetros de glicina
p = prueba exacta de Fisher.

* = Existe diferencia significativa

No existe significancia estadística en los casos estudiados por lo tanto no hay correlacion entre las variables estudiadas.

9. Análisis y discusión

En la Unidad de Genética de la Nutrición (UGN) el principal motivo por la cual se solicita realizar determinaciones de glicina en LCR y suero es por sospecha de hiperglicinemia no cetósica. A lo largo de la experiencia en la UGN se ha visto que existe gran dificultad para saber si las alteraciones vistas en el cociente³⁹ realmente corresponden a un defecto en la degradación de glicina o a causas secundarias, como por ejemplo las interacciones medicamentosas o las crisis *per se*. Ante esta duda y sabiendo que existen otras causas en las que se encuentra aumento en la concentración de aminoácidos en LCR se fundamentó la presente investigación.

	Tada y Hayasaka	UGN*
Plasma	56-308	64.5-211.4
LCR	2.9-10.4	5.0-26.8
LCR/Suero	0.012-0.040	0.03-0.12

Tabla 6 Concentraciones de glicina en suero y líquido cefalorraquídeo (μM) en Recién nacidos

** Unidad de Genética de la Nutrición

9.1. Análisis de dos grupos

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de glicina y el cociente de ambos grupos estudiados, sin embargo, observamos (Gráfica 1 y 3) algunos individuos con estos parámetros claramente elevados con respecto a la mayoría ("out liers"), tanto en el grupo con crisis como en el grupo sin crisis lo que sugiere la posibilidad de que la distribución de concentración de glicina en LCR y el cociente sea binomial y por lo que en realidad existan dos grupos diferentes de pacientes. Una posibilidad es que sea de origen genético el grupo alto (HGNC) y la otra posibilidad es que sea el reflejo de variaciones interindividuos en el metabolismo de la

glicina, sean de carácter fisiológico o debidas al padecimiento de base. Sin embargo, el número de la muestra es pequeño para concluir en definitiva.

Por otro lado la no significancia estadística puede ser por efecto del tamaño de la muestra ya que llama mucho la atención el fenómeno de que la mayoría de las elevaciones importantes se presentan en el grupo de pacientes con crisis convulsivas (Gráfica 1 y 3).

Con objeto de determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en otros parámetros evaluados en aquellos pacientes que presentan concentraciones elevadas de glicina en LCR con los que presentan concentraciones elevadas normales, evaluamos estos dos grupos, sin embargo, a pesar que los niveles de glicina si son estadísticamente diferentes, ningún otro parámetro evaluado lo es, como se observa en la Tabla 4.

Tampoco se encontró alguna asociación estadísticamente significativa entre la concentración de glicina en LCR y otros factores estudiados como se puede observar en la Tabla 5.

Del total de los pacientes que presentaron alteraciones en la concentración de glicina en LCR en 7 la punción lumbar fue por sospecha de neuroinfección, misma que se documentó en 4 de ellos.

En el total de pacientes (36 muestras) sólo se encontró un caso de hiperglicinemia. Este se presentó en el paciente χ del grupo sin crisis convulsivas, el cual también presentó glicina elevada en el LCR, pero el cociente LCR/suero fue normal, esto descarta una hiperglicinemia no cetósica pero no descarta otras causas de hiperglicinemia.

9.2. Análisis individual de los casos extremos.

Cinco pacientes presentan alterado el cociente en el grupo de crisis convulsivas, mismos que tuvieron concentraciones de glicina en LCR elevadas, (K,T,P,D,y D) de estos dos presentan tanto proteínas como celularidad anormal (K,T) y uno presenta celularidad anormal (P). En el grupo sin crisis convulsivas existen 3 pacientes que presentan el cociente alterado sin embargo, en uno de ellos esta alteración es a expensas de la disminución de glicina en suero (δ), así como alteraciones en proteínas y celularidad, aunque tuvo una concentración de glicina en LCR normal. Esta observación es muy importante puesto que hay que recordar que el valor diagnóstico del cociente está dado por la elevación de glicina en LCR y no por una disminución de glicina en suero que puede ser secundarias a múltiples causas, por ejemplo dilución de la muestra por exceso de líquido del paciente, formación de acilglicinas endógenas, etc⁴¹. Es por esto que lo más importante a considerar es el cociente.

Para establecer el diagnóstico de HGNC es esencial determinar en suero y LCR la concentración de glicina y calcular el cociente $\text{Gli LCR} / \text{Gli Suero}$ este es mayor de 0.09 en pacientes con HGNC⁴², sin embargo no existe información sobre la especificidad diagnóstica de este resultado. En el presente estudio en una muestra de 36 niños encontramos 8 individuos con el cociente anormal por lo que es posible pensar que existen otras causas que alteran dicho cociente, dentro de estos 8 individuos 4 tienen un valor francamente elevado (Gráfica 3) en tanto que en los otros 4 el valor es moderadamente elevado lo que sugiere la posibilidad de que la distribución de concentración de glicina en LCR y el cociente sea binomial y por lo que en realidad existan dos grupos diferentes de pacientes. Una posibilidad es que sea de origen genético el grupo alto (HGNC) y la otra posibilidad es que sea el reflejo de variaciones interindividuos en el metabolismo de la glicina, sean de carácter fisiológico o debidas al

padecimiento de base. Sin embargo, el número de la muestra es pequeño para concluir en definitiva.

La concentración de glicina en LCR de nuestros pacientes anormales caen dentro de los valores referidos para la HGNC atípica⁴³, sin embargo para confirmar este diagnóstico serían necesarios estudios posteriores de seguimiento en la concentración Gli en LCR y en caso de que esta continúe siendo elevada y el cociente anormal un diagnóstico definitivo sólo lo daría el estudio de la actividad enzimática⁴⁴.

10. Conclusiones

- 1. Los valores de glicina en LCR y suero de los niños con y sin crisis convulsivas estudiados no son estadísticamente diferentes.**
- 2. Cuando existe alteración del cociente, para que este sea diagnóstico de hiperglicinemia no cetósica siempre debe ser aunado al cuadro clínico del paciente.**
- 3. El cociente de LCR/Suero de glicina es un parámetro que debe ser interpretado con cuidado y siempre en relación a otros parámetros del LCR.**
- 4. El LCR del paciente con neuroinfección y con crisis convulsivas además de las alteraciones ya conocidas tales como aumento de proteínas y aumento de la celularidad también puede presentar aumento de la concentración de la glicina.**
- 5. Mientras los pacientes cursen con cuadros de neuroinfección activa, con alteración en el LCR, el diagnóstico de la NKH basado en el cociente siempre debe corroborarse con el seguimiento una vez que se normalice las alteraciones de LCR.**

10.1. Se recomienda para un estudio posterior

Estudios adicionales para discernir las posibles causas de la elevación de la concentración de glicina en LCR así como el cociente anormal. Se requiere un seguimiento de los pacientes para determinar si las observaciones obtenidas de los cocientes son debidas al padecimiento de base o si su origen es genético para con esto saber si realmente un cociente elevado sólo se tiene en caso de una HGNC. Tener un grupo de pacientes más grande.

11. Bibliografia

1. Nyhan W L. Metabolism of glycine in the normal individual and the patients with non-ketotic hyperglycinemia. *J Inherited Metab Dis* 1982, 5:105.
2. Nyhan W.L. Nonketotic hyperglycinemia, in Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 4th ed. New York, McGraw-Hill, 1978, 518-527.
3. Lehninger L. A, Nelson L. D, Cox M.M. *Principles of biochemistry* 2 ed Worth publishers 1993, 526-27, 700-01.
4. Tada K, Hayasaka K. Non ketotic hyperglycinemia clinical and biochemical aspects. *Eur J Pediatr* 1987, 146:221, .
5. Probst A, Cortes R, Palacios JM. The distribution of glycine receptors in the human brain. A light microscopic autoradiographic study. *Neuroscience* 1986, 17:11 .
6. Ascher P, Johnson JW. The NMDA receptor, its channel and its modulation by glycine, In Watkins JC, Collingridge GL: *The MND A receptor*. Oxford University Press 1989, 109 .
7. Krnjeric K. Chemical nature of synaptic neurotransmission in vertebrates. *Physiol Rev* 1974, 54:418 .
8. Kikuchi G. The glycine cleave system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol Cell Biochem.* 1973, 1:169-187.
9. Zorblin MA, Wamsley JK, Kiehor MJ. Glycine receptor: light microscopic localization with 3H-strychnine. *J Neuroscience* 1982, 1:532 .
10. Perry TL, Urquhart N, MAclean J, Evans ME, Hansen S, Davidson AGF, Applegarth DA, MAcleod PJ, Lock JE. Nonketotic hyperglycinemia. *N Engl J Med* 1975, 292: 1269.
11. Nyhan W L. Nonketotic hyperglycinemia. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly Ws, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York 1989, 743-753.
12. Blenkinsopp WK, Dupont PA: Dipropylacetate (valproate) and glycine metabolism. *Lancet* 2:617, 1977.
13. Nyhan W L. Nonketotic hyperglycinemia. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly Ws, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York 1989, 743-753.
14. Tada K. Nonketotic hyperglycinemia. Clinical and metabolic aspects. *Eur J pediatr* 1988, 3827-35.
15. Okken A, De Groot CJ, Hommes FA. Nonketotic hyperglycinemia. *J Pediatr* 1970, 77:164.
16. Heilblm DI, Evans HE, Glass L, Agbayani MM. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid. *Arch Neurol*, 1978, 5: 765-768.

17. Baumgartner R, Ando T, Nyhan WL: Nonketotic hyperglycinemia. *J Pediatr* 1969, 75:1022.
18. Scriber CR, White A, Sprague W, Horwood SF: Plasma-CSF glycine ratios in normal nonketotic hyperglycinemia. *N Engl J Med* 1975, 293:778.
19. Frazier MD, Summer GK, Chamberlin HR: Hyperglycinuria and hyperglycinemia in two siblings with mild developmental delay. *Am J Dis Child* 1978, 132:777.
20. Holmgren G, Blomquist HK: Nonketotic hyperglycinemia in two sibs with mild psychoneurological symptoms. *Neuropaediatric* 1977, 8:67.
21. Fienney DB, Pellock J, Bousounis D, Hunt P, Nance C, Wolf B: Nonketotic hyperglycinemia in two retard adults: A mild form on infantile nonketotic hyperglycinemia. *Neurology* 1983, 33:1064.
22. Schiffman R, Kaye EM, Willis JK III, Africk D, Ampola M: Transient neonatal hyperglycinemia. *Ann Neurol* 1989, 25:201.
23. Singer HS, Valle D, Hayasaka K, Tada K: Nonketotic hyperglycinemia: studies in an atypical variant. *Neurology* 1989, 39:286.
24. Lauder AS, Davidson A, Gooman SI, Greene CL: Transient nonketotic hyperglycinemia in neonates. *J Pediatr* 1989, 114:1013.
25. MacDonald JT, Sher PK: Ophthalmoplegia as a sign of metabolic disease in the newborn. *Neurology* 1977, 27:971.
26. Jois M, Ewart S, Brosnan JT: Regulation of glycine metabolism in rat liver mitochondria. *Biochem J*. 1992, 283:435.
27. Tada K: Non ketotic hyperglycinemia. *J Inher Metab. Dis.* 1982, 5:105.
28. Hamilton H.K. Sistema nervioso central diagnóstico clínico. Manual Moderno Interamericana, 185:837-42.
29. Davidoff R, Graham T, Shamk R: Changes in amino acid concentrations associated with loss of spinal interneurons. *J Neurochem* 1976, 14:105
30. Segal M.B. Extracellular and cerebrospinal fluids. *J Inher Metab Dis.* 1993, 16:617-638.
31. Segal M.B, Pollay M. The secretion of cerebrospinal fluid. *Exp eye res* 1977, 25:127-148.
32. Berman S. Crisis convulsivas. *Pediatric decision making*, 2^o ed. Philadelphia, B.C. Decker Inc, 1991:268-275
33. Berhman R.E, Kliegman R.M, Nelson W.E. Crisis convulsivas. *Tratado de pediatría*. 14th ed California, McGraw-Hill, 1992, (2), 1814-22.
34. Hill D, Burnworth L, Skea W, Pfeifer R. Quantitative HPLC analysis of plasma amino acids as orthophthalaldehyde/ethanethiol derivatives. *J Liquid Chromatog* 1982, 2369-2393.

35. Abecassis J, David-Eteve Ch, Soun A. The separation of 24 OPA-AAO of natural origen and quantitative analysis of tyrosine by means of HPLC. *J Liquid chromatog* 1985, 8:135-153.
36. Rajendra W. High performance liquid chromatography. Determination of aminoacids in biological samples by precolum derivatization with o-phthalaldehyde. *J Liquid Chromatogr*, 1987,10:941-955.
37. García de Marlina A, Del Castillo Benito: *Cromatografía líquida de alta resolución*. Limusa 1988, 37-97.
38. Tada. K, Kure S, Non ketotic hyperglycemia. *J Inher Metab. Dis.* 1993, 16:691-703.
- 39 Vela M, Ibarra I, Herreman K, Alcocer C, Cicerón I, Maulén I, Velázquez A. Dificultades para el diagnóstico de la hiperglicemia no cetocica y la determinación de las concentraciones de Glicina. IV Foro Anual de Investigación Científica INP. México, 1994.
40. Duran M, Dorlan L, Wadman S, Berger R. Group test for selective screening of inborn errors of metabolism. *Eur J. Pediatr* 1994 Suppl : 27-32
41. Kaakola S, Oja S, Icén A, Palo J. Leukocyte glutamate dehydrogenasa and CFS amino acids in late ataxias. *Acta Neural Scand* 1990, 82:292-296
42. Hamosh A, Johnston M, Valle D. Nonketotic hyperglycemia. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* 1994. Tomo I, 6° ed.1344.
43. Luder S, Goodman I, Greene L. Transient nonketotic in neonates. *J Inher Metab. Dis.* 1993, 114:1013-1015.
44. Kure S, Narisawa K, Tada K. Enzymatic diagnosis of nonketoti hyperglycemia with lymphoblasts. *J Inher Metab. Dis.* 1993, 120:95-98.

Anexo

HOJA DE CONCENTRACION DE DATOS

DETERMINACION DE NIVELES DE GLICINA EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO EN UNA MUESTRA DE NIÑOS MEXICANOS.

I. FICHA DE IDENTIFICACION

1. Nombre: _____
2. Sexo: _____
0 = Femenino 1 = Masculino
3. Edad (años y meses) _____
4. Registro en el I.N.P. _____
5. No. de Folio en Urgencias _____
6. Servicio _____
0 = Urgencias 1 = Otro

¿Cuál? _____

II. MOTIVO DE LA PUNCIÓN LUMBAR

7. Motivo de la Punción Lumbar (PL)
0 = Crisis Convulsiva 1 = Suspensa de Vacunación
3 = Otro 0 = Estudios Previos
 8. Fecha de la toma de PL (diferente) _____
 9. Hora de la toma de la PL _____
 10. Aspecto del LCR _____
0 = Agua de mar 1 = Turbio 2 = Purulento
3 = Hemático 4 = Otro
 11. Puntos _____
0 = Presente 1 = Ausente 0 = Se ignora
 12. Proteínas (mg%) _____
 13. Glucosa en LCR (mg%) _____
 14. Células (mm³) _____
0 = Ausente 1 = Presente
- Especificar número: _____

15. Leucocitos _____
0 = Ausente 1 = Pólv. 2 = Leucocitos 0 = Bacteriemia

Especifique %: _____

16. Tinción de Gram _____
0 = Positiva 1 = Negativa 0 = Se ignora

17. Cultivos _____
0 = Presente 1 = Ausente 0 = Se ignora

Especifique %: _____

18. Glucosa en Sangre (mg%) _____

III. CRISIS CONVULSIVAS

19. Presencia de C.C. _____
0 = Sí 1 = No 0 = Se ignora

20. ¿Ha presentado C.C. en otra ocasión? _____
0 = Sí 1 = No 0 = Se ignora

¿Cuándo? _____

21. Tipo de crisis convulsiva _____
0 = Parcial 1 = Generalizada 2 = Tónico 3 = Clónicas
4 = Tónico-clónicas 0 = Ausente 0 = Otro 0 = Bacteriemia

Especifique: _____

22. Curso de la C.C. _____
0 = Falso 1 = Síntomas 2 = Otro 0 = Se ignora

Especifique: _____

IV. MEDICAMENTOS ACTUALES

23. Anticonvulsivos _____
0 = Ninguno 1 = Fenitoína 2 = DPH 3 = Al. Valproato
4 = Otro 0 = Bacteriemia

Especifique: _____

24. Antibióticos _____
0 = Ninguno 1 = ampicilina 2 = AMK 3 = Penicilina 4
= Otro 0 = Bacteriemia

25. Otros medicamentos _____
0 = Ninguno 1 = Anfotericina 2 = Anfotericina 3 = Otros
0 = Bacteriemia

Especificar cuales: _____

Nombre: _____ Dosis: _____ Fecha inicio: _____

Fecha de llenado: _____

Clave de la muestra: _____

Observaciones: _____