

Enolasa específica de neurona en dos recién nacidos con depresión ligera al nacer

Neuron- specific Enolase in two newborns presenting with moderate depression at birth

Raisa Bu-Coifiu Fanego,^I Alberto Dorta Contreras,^{II} Elena Noris García,^{III} Barbara Padilla Docal,^{IV} Lourdes Pupo Portal,^V Alina Gonzalez Hernández ^{VI}

^I Especialista de II Grado en Pediatría. Máster en Infectología. Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL). Facultad de Ciencias Médicas «Dr. Miguel Enríquez». La Habana, Cuba.

^{II} Doctor en Ciencias de la Salud. Licenciado en Bioquímica. Investigador y Profesor Titular. Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL). Facultad de Ciencias Médicas «Dr. Miguel Enríquez». La Habana, Cuba.

^{III} Especialista de II Grado en Inmunología. Máster en Infectología. Investigadora Auxiliar. Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL). Facultad de Ciencias Médicas «Dr. Miguel Enríquez». La Habana, Cuba.

^{IV} Licenciada en Biología. Investigadora Agregada. Máster en Infectología. Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL). Facultad de Ciencias Médicas «Dr. Miguel Enríquez». La Habana, Cuba.

^V Especialista de I Grado en Neonatología. Máster en Atención Integral al Niño. Hospital Ginecoobstétrico Docente de Guanabacoa. La Habana, Cuba.

^{VI} Especialista de I Grado en Neonatología. Máster en Atención Integral al Niño. Hospital Ginecoobstétrico Docente de Guanabacoa. La Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La enolasa específica de neurona es una isoenzima que se vierte al torrente sanguíneo después de un episodio de daño neuronal. En los procesos de hipoxia neonatal estos valores enzimáticos en suero suelen estar alterados. El objetivo del presente artículo fue estudiar la enolasa específica de neurona en suero de 2 recién nacidos con Apgar bajo y determinar si, en el seguimiento durante un año, dichos pacientes presentaban trastornos del desarrollo psicomotor.

MÉTODOS. Se tomaron muestras de suero al momento del nacimiento y a las 72 h siguientes. Se determinaron los niveles de enolasa específica de neurona por un

método inmunoenzimático de tipo ELISA. Cada muestra fue evaluada por el método de reacción en cadena de la polimerasa para citomegalovirus, en el Instituto de Inmunología de Wuersburg (Alemania). También se cuantificaron anticuerpos contra citomegalovirus de clase IgM e IgG, en el Laboratorio de Neuroquímica de la Universidad Georg August de Goettingen (Alemania). Se recogieron los datos clínicos de interés de cada recién nacido y al año se citaron a estos pacientes y se les realizó un examen físico para evaluar su neurodesarrollo.

RESULTADOS. Las cifras de enolasa estuvieron incrementadas tanto al nacimiento como a las 72 h, con anticuerpos anticitomegalovirus de clase IgG que fueron transferidos de la madre a través de la placenta. No se encontró presencia de este virus en el momento del nacimiento. En el examen físico y neurológico realizado al año se constató que los niños evolucionaban satisfactoriamente hasta esa fecha.

CONCLUSIONES. Se recomienda extender el estudio hasta los 3 años de vida y aumentar el número de pacientes estudiados, con énfasis en aquellos casos cuyo Apgar es menor de 5 a los 5 min del nacimiento.

Palabras clave: Enolasa específica de neurona, neonato, Apgar, neurodesarrollo, citomegalovirus.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Neuron-specific Enolase of is an isoenzyme present in blood stream after a neuronal damage episode. In processes of neonatal hypoxia, these enzymatic values in serum may be altered. The aim of present paper was to study Enolase specific of neuron in the serum of two newborns with low Apgar score and to determine if, during a one year follow-up, such patients presented disorders of psychomotor development.

METHODS: We took serum samples at birth and at 72 hours. Levels of Enolase specific of neuron by immunoenzymatic method type ELISA were determined. Each sample was assessed by polymerase chain reaction (PCR) to cytomegalovirus in Wuersburg Institute of Immunology (Germany). Also, we quantified antibodies to IgM and IgG cytomegalovirus in Neurochemistry Institute of Georg August of Goettingen University (Germany). Interesting clinical data of each newborn were collected and after a year, all these patients were cited for a physical examination to evaluate tits neurodevelopment.

RESULTS: Enolase figures were increased both at birth and at 72 hours, with IgG anticytomegalovirus antibodies from mother through placenta. At birth there was not presence of this virus. At physical and neurological examination performed at 1 year it was possible to confirm that children evolved adequately until now.

CONCLUSIONS: Study must to be prolonged until 3 years of life, and to increase number of study patients, emphasizing on those with an Apgar score lower than 5 at 5 minutes post-birth.

Key words: Neuron-specific Enolase, neonate, Apgar score, neurodevelopment, cytomegalovirus.

INTRODUCCIÓN

A partir de las últimas décadas la hipoxia neonatal representa un gran problema, por la morbilidad tan elevada y por la ocurrencia de secuelas neurológicas secundarias respecto a los sucesos perinatales.

Con el objetivo de reconocer no sólo al feto asfíctico sino también la intensidad de la asfixia y su posible implicación en posteriores lesiones neurológicas, diversos autores han estudiado la enolasa específica de neurona (EEN), una enzima glicolítica localizada en el citoplasma celular (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa), que convierte el 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato y tiene tres subunidades: alfa, beta y gamma.¹ Esta enzima es liberada en el sistema nervioso central cuando se lesiona el tejido neural, y es un marcador de lesión neuronal.²

La enolasa gamma es conocida como EEN y se encuentra predominantemente en neuronas y tejidos neuroectodérmicos; representa el 1,5 % de todas las proteínas solubles cerebrales y es estable en los fluidos biológicos. En los RN asfícticos graves se han encontrado concentraciones altas de EEN en el líquido cefalorraquídeo (LCR) a las 12 y 72 h de la vida.³

Reiber y colaboradores estudiaron concentraciones de EEN en sangre como parámetro pronóstico en las enfermedades cerebrovasculares.⁴

La incidencia de la asfixia varía según esté definido este concepto y a veces cambia de un hospital a otro de acuerdo con el número de nacimientos y la morbilidad asociada a este. Se puede estimar que tiene una incidencia general de alrededor del 0,2 al 0,4 % de los recién nacidos.⁵

En nuestro país los eventos de hipoxia neonatal son relativamente frecuentes y debido a los trastornos que estos ocasionan para el neurodesarrollo del niño, se propone un estudio de la enolasa específica de neurona en suero de recién nacidos con Apgar bajo, y su seguimiento posterior al año del nacimiento, con el objeto de determinar si en este período dichos pacientes mostraron evidencias de trastornos del desarrollo psíquicomotor.

MÉTODOS

Como parte de este informe preliminar de los primeros casos que integran la investigación que estamos realizando, se tomaron muestras de suero al momento del nacimiento y a las 72 h siguientes. Las muestras permanecieron congeladas en alícuotas a -30 °C hasta el momento de su uso.

Se recogieron los datos clínicos de interés, de cada recién nacido, a partir de una encuesta. Al año se citaron a estos pacientes y se les realizó un examen físico para evaluar su neurodesarrollo. Se determinaron los niveles de enolasa específica de neurona por un método inmunoenzimático tipo ELISA, NSE EIA DRG Diagnostics GmbH (Alemania).

El método es un ensayo inmunoenzimático de fase sólida, no competitivo, basado en dos anticuerpos monoclonales derivados de ratones dirigidos contra dos determinantes antigénicos separados de la molécula de enolasa. El anticuerpo monoclonal usado se une a la subunidad γ de la enzima y de esta forma es capaz de detectar las isoformas $\gamma\gamma$ y $\gamma\alpha$. Los controles y las muestras de suero de los pacientes se incuban junto con un anticuerpo Mab E21 anti-NSE biotinilado y con peroxidasa de rábano picante marcada con el anticuerpo monoclonal MabE17

antiNSE en las tiras de las microplacas recubiertas con estreptavidina. Después del lavado se adiciona el sustrato-cromógeno (peróxido de hidrógeno con 3,3',5,5' tetrametilbencidina) a cada pocillo y se produce la reacción enzimática correspondiente. Se desarrolla un color azul y su intensidad depende de la cantidad de enolasa presente en la muestra.⁶

La placa de microtitulación se lee en un espectrofotómetro *SUNRISE* con el programa computarizado *Magallanes* a 620 nm (Crailsheim, Alemania). La curva estándar se construye para cada corrida ploteando la absorbencia contra los valores de concentración de cada estándar. Los resultados de los pacientes se obtienen y se leen entonces de la curva.

Cada muestra fue evaluada con el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para citomegalovirus (CMV), en el Instituto de Inmunología de Wuersburg, Alemania. También se cuantificaron los anticuerpos contra CMV de clase IgM e IgG en el laboratorio de Neuroquímica de la Universidad Georg August de Goettingen, Alemania.

RESULTADOS

El primer paciente estudiado es una recién nacida a término, segunda hija de madre de 33 años, con diabetes gestacional controlada. El parto fue vaginal espontáneo. El Apgar fue 4 al minuto y 7 a los 5 min; el peso al nacimiento fue 3950 g y el recién nacido egresó del hospital con diagnóstico de hemiparesia braquial derecha, circulares de cuello y pies, dificultad respiratoria y depresión ligera al nacer.

Se estudió el segundo niño, un recién nacido a término con crecimiento intrauterino retardado. Es el primer hijo de una madre de 25 años, sana y con embarazo controlado. El parto vaginal fue en avalancha, con breve rotura del cordón umbilical. El niño tuvo un Apgar 3 al minuto y 7 a los 5 min. Pesó 2450 g al nacer y fue egresado con un diagnóstico de ictericia fisiológica agravada y depresión ligera al nacer.

A ambos niños se les realizó ultrasonido de cráneo, potenciales evocados -que fueron normales- y el estudio del fondo de ojo no mostró alteraciones. Los valores promedios de enolasa específica de neurona al nacimiento y a las 72 h se muestran en la tabla 1. Los valores de enolasa estuvieron por encima de la cifra normal que es de 2 µg/L, lo cual indica la existencia de un daño neuronal.

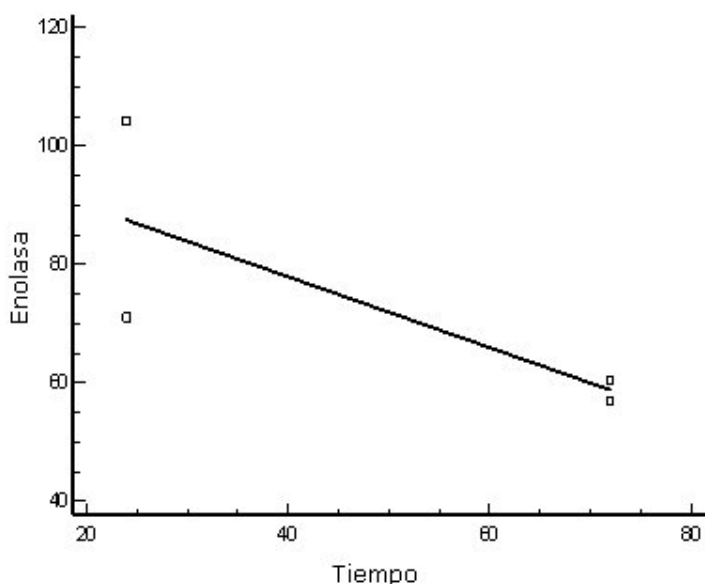
Tabla 1. **Valores medios de enolasa específica de neurona (n = 2)**

Valores	Enolasa al nacimiento	Enolasa a las 72 h
Valor menor	71,3 µg/L	56,98
Valor mayor	104 µg/L	60,55
Media aritmética	87,51	58,7
Intervalo de confianza para la media 95%	-121,94 a 296,97	36,08 a 81,44
Desviación estándar	23,3	2,52
Error estándar de la media	16,4	1,7

No hubo diferencias significativas cuando comparamos los valores medios de enolasa entre la primera y segunda muestra ($t = 1,734$; $g/L = 2$; $p = 0,2251$). La ecuación de regresión lineal y su figura se muestran en la figura y la tabla 2.

Tabla 2. **Análisis de regresión lineal**

Variable dependiente (Y)	Variable independiente (X)	Tamaño de la muestra	Coefficiente de determinación	Desviación estándar residual
Enolasa	Tiempo en hora	4	0,6005	16,5814
Ecuación de regresión	$Y = 101,89 - 0,5990 X$			
Parámetro	Coefficiente	Error estándar	Valor de t	p
Intercepto	101,89	18,53	5,49	0,0315
Pendiente	-0,59	0,34	-1,73	0,2251



$$t = 1,734 \quad g/L = 2 \quad p = 0,2251$$

Figura. **Ecuación de regresión lineal.**

La variación de estos valores de enolasa entre la media inicial y a las 72 h no disminuyó significativamente dado por la pendiente con $p = 0,2251$ de la recta y que se corresponde con el análisis de varianza realizado, según puede apreciarse en la tabla 3. Todas las muestras evaluadas fueron negativas de citomegalovirus (CMV).

Tabla 3. **Análisis de varianza**

Fuente	Grado de libertad	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados
Regresión	1	826,56	826,56

Residual	2	549,88	274,94
----------	---	--------	--------

Cociente F = 3,0063; p = 0,225

Tampoco se encontraron anticuerpos de clase IgM de CMV; sin embargo, todas fueron positivas de CMV cuando se cuantificaron los anticuerpos de clase IgG.

Al año de edad se les realizó a los pacientes un seguimiento por consulta, con interrogatorio a los padres y examen físico neurológico a los niños.

DISCUSIÓN

Está descrito que el CMV puede ocasionar trastornos prenatales, perinatales o posnatales en el niño. En nuestros casos estudiados pudimos comprobar que no hubo virus presente en el momento del nacimiento del niño ni infección activa de los niños estudiados en el momento del parto. Las madres estuvieron infectadas en algún momento antes del parto o durante el embarazo, porque los anticuerpos de clase IgG pasan a través de la placenta y se cuantificaron en el suero de los recién nacidos.

Se recomienda que en futuros pacientes se estudie también la orina, porque sería otra vía para verificar si existe infección por CMV antes del nacimiento.

Los niveles de enolasa de los dos pacientes tanto al nacimiento como a las 72 h de nacidos mostraron cifras elevadas, lo cual indica que hubo un daño neuronal. Además se pudo comprobar que aunque disminuyeron los valores de enolasa a las 72 h, esta disminución no fue significativa. Este hecho indica que el daño neurológico se mantiene en la segunda toma de muestra, lo cual podría ser un indicador de futuros trastornos en el neurodesarrollo de los niños estudiados.

En estudios en Turquía⁷ se estudiaron los niveles de enolasa en suero y LCR a las 24-72 h después de la vida en 21 niños. Los niños fueron supervisados durante 2 años con un protocolo de evaluación neurológico y del desarrollo estandarizado. El resultado total en 2 años fue clasificado como favorable o adverso: 12 niños tenían encefalopatía y 9 niños tenían encefalopatía de moderada a grave. Los niveles de enolasa específica en fluido cerebroespinal y suero fueron considerablemente correlacionados con el grado de encefalopatía. Esto apoya la importancia que tiene el valor predictivo de la enolasa específica de neurona.

Diversos estudios en pacientes adultos con hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracerebral, infartocerebral, hipertensión endocraneal, traumatismo craneoencefálico, convulsiones y fracaso cardíaco han señalado una correlación entre las concentraciones de EEN en el LCR y la gravedad de la lesión sobre el sistema nervioso central (SNC).⁸

Nara y colaboradores demostraron que las concentraciones elevadas de EEN en el LCR o en el suero se correlacionaban con una mala evolución y muerte en los niños comatosos.⁹

La gran mayoría de las causas de hipoxia perinatal son de origen intrauterino. Aproximadamente el 5 % ocurre antes del inicio del trabajo de parto, el 85 % durante el parto y período expulsivo y el 10 % restante durante el período

neonatal. La asfixia fetal produce afectación multisistémica, por lo tanto, la sintomatología depende del grado en que ha sido afectado cada órgano. En algunos casos sólo hay manifestaciones en un solo órgano. Los órganos más afectados son el riñón, el SNC, el cardiovascular y el pulmón.¹⁰

La asfixia intrauterina se expresa clínicamente al nacer como una depresión cardiorrespiratoria, que si no es tratada oportunamente agravará esta patología. Otras causas que pueden presentarse como una depresión cardiorrespiratoria son: las malformaciones congénitas, la prematuridad, las enfermedades neuromusculares y las drogas depresoras del SNC administradas a la madre durante el parto.¹¹

El primero de nuestros pacientes estudiados presentó causas obstétricas que se asocian a la asfixia perinatal. Entre los factores anteriores al parto encontramos diabetes gestacional y, entre los asociados al parto, distocia de hombros y circulares irreductibles, acompañados también de factores de riesgo biológico y dificultad respiratoria.

El segundo paciente presentó como factores asociados al parto a la hipoxia, breve rotura del cordón umbilical y factores de riesgo biológico como un problema nutricional del feto en un período corto antes del nacimiento y, como consecuencia de este problema, el paciente tuvo afectaciones en el peso pero con talla y circunferencia cefálica adecuadas (CIUR asimétrico).

La asfixia afecta todos los órganos y sistemas en diverso grado, según su intensidad y duración. Es en el sistema nervioso central donde se produce la lesión más relevante, por sus consecuencias en cuanto a mortalidad y secuelas. El daño causado por la asfixia dependerá en último término de la medida en que se altera la entrega de oxígeno a los tejidos.¹²

La gravedad de la hipoxia y de la depresión respiratoria se evalúa con diversos parámetros cénicos y de laboratorio. Uno de estos es la prueba de Apgar. Este ha demostrado a través de los años ser de gran utilidad para evaluar la condición del recién nacido al nacer. Se evalúa al minuto y a los 5 minutos de vida. El Apgar al minuto expresa principalmente la evolución prenatal. El Apgar a los 5 minutos tiene un mayor valor pronóstico en cuanto a la normalidad o potencial anormalidad neurológica y riesgo de mortalidad.¹³

Las pruebas de Apgar de estos recién nacidos presentaron una depresión leve: Apgar < de 3 al minuto y > 7 a los 5 min del nacimiento. Esta prueba es, por lo tanto, una información esencial de la anamnesis perinatal.

Sin embargo, al año de su evolución no se encontraron trastornos evidentes desde el punto de vista clínico del neurodesarrollo. Se le realizó un examen físico neurológico y no se encontraron signos anormales aunque se evaluaron algunos parámetros que dependen de la apreciación de los padres ya que en estos casos los padres pretenden autoengañarse con la evolución de sus hijos como un mecanismo de defensa.

Es de esperar que cuando el número de pacientes se incremente, se encuentren niños con afectaciones del neurodesarrollo y podamos, de acuerdo con los estudios de enolasa, llegar a pronosticar los pacientes. También es recomendable seguir evolutivamente a estos niños hasta los 3 años de vida, para poder detectar problemas del neurodesarrollo a más largo plazo.

Es esencial la valoración que realizamos a estos niños para conocer bien el perfil del neurodesarrollo, con las características de las diferentes etapas y los efectos que pueden causar acontecimientos adversos, no solo para valorar la evolución de estos niños, sino para detectar precozmente problemas, establecer las actividades terapéuticas precisas, e involucrar tanto a la familia como a otros especialistas en el proceso asistencial para una intervención temprana cuyos objetivos es mejorar los cocientes madurativos, enriquecer el medio físico de aquellos, mejorar la interacción madre-hijo y con todo esto, prevenir alteraciones del SNC.¹⁴

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Celtik C, Acuna B, Oner N, Pala O. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2004;26:398-402.
2. Berger RP, Adelson PD, Richichi R, Kochanek PM. Serum biomarkers after traumatic and hypoxemic brain injuries: insight into the biochemical response of the pediatric brain to inflicted brain injury. *Dev Neurosci* 2006;28:327-35.
3. Dorta Contreras AJ, Tabío Valdés E, Tabío Valdés A, Delgado Fernández C, Reiber H. Non increased neuron-specific enolase concentration in cerebrospinal fluid during first febrile seizures and a year follow-up in pediatric patients. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56:540-4.
4. Shaarschmidt H, Prange HW, Reiber H. Neuron-Specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular. *Stroke* 1994;25:558-65.
5. Murray DM, Ryan CA, Boylan GB, Fitzgerald AP, Connolly S. Prediction of seizures in asphyxiated neonates: correlation with continuous video-electroencephalographic monitoring *Pediatrics* 2006;118:41-6.
6. Pahlman S, Esscher T, Bergvall P, Odelstad L. Purification and characterization of human neuron-specific: Radioimmunoassay development. *Tumor Biol* 1984;5:127-39.
7. Tekgul H, Yalaz M, Kutukculer N, Ozbek S, Kose T, Akisu M, Kultursay N, Gokben. Value of biochemical markers for outcome in term infants with asphyxia. *Pediatr Neurol* 2004;31:326-32.
8. Dindic J, Obradovic S. Monitoring of neurological parameters in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Med Pregl.* 2006;59:531-8.
9. Nara T, Nozaki H, Nakae Y, Arai T, Ohashi T. Neuron-specific enolase in comatose children. *Am J Dis Child* 1988;142:173-4.
10. Saugstad OD, Ramji S, Vento M. Oxygen for newborn resuscitation: how much is enough? *Pediatrics.* 2006;118:789-92.
11. Baskett TF, Allen VM, O'Connell CM, Allen AC. Predictors of respiratory depression at birth in the term infant. *BJOG.* 2006;113:769-74.

12. Shah PS, Beyene J, To T, Ohlsson A, Perlman M. Postasphyxial hypoxic-ischemic encephalopathy in neonates: outcome prediction rule within 4 hours of birth. Arch Pediatr Adolesc Med 2006;160:729-36.
13. Perlman JM. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatrics 2006;117:S28-33.
14. Hernández Salas S. Seguimiento de niños de alto riesgo biológico. Rev Esp Ped 2002;58:44-52.

Recibido: 26 de diciembre de 2007.

Aprobado: 13 de julio de 2008.

Raisa Bu-Coifiu Fanego. LABCEL Apartado 10049 CP 11000 La Habana, Cuba.
Correos electrónicos: labcel@infomed.sld.cu y adorta@infomed.sld.cu