

Análisis de la variación circadiana de melatonina y metabolitos del triptófano en niños con síndrome de Down

María de los Reyes Jaldo Jiménez *, Gema Árbol Fernández*, Francisco Ignacio Sánchez Osorio**, Teresa Rica Tellado*, Julio Romero González***, José Uberos Fernández****, Antonio Molina Carballo****. * Centro de Salud de Peligros. Distrito Metropolitano de Granada. **Distrito Granada Nordeste. ***Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. ****Hospital Universitario San Cecilio de Granada

Originales

RESUMEN

Introducción: Muchos de los cambios degenerativos observados en pacientes con síndrome de Down (SD) han sido relacionados con los efectos patológicos de radicales libres, y por esta razón es interesante determinar los niveles presentes en estos pacientes de moléculas antioxidantes como melatonina con importantes consecuencias neurotóxicas.

Pacientes y Métodos: El estudio se realizó en 15 niños con SD, comparado con un grupo de control de 15 niños, emparejados para la edad y el sexo. La melatonina fue analizada en suero por radioinmunoanálisis (RIA) a lo largo de un ritmo circadiano y los metabolitos del triptófano (vía Kynurenina) por cromatografía con capa fina.

Resultados: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles nocturnos y diurnos de melatonina de ambos grupos, con un nivel claramente inferior en el grupo de SD. Igualmente, se encontraron diferencias significativas en los niveles diurnos y nocturnos de sus metabolitos.

Conclusiones: A pesar de que los niños con SD conservan un ritmo de secreción circadiana de melatonina, los pacientes con SD presentan niveles más bajos en plasma de melatonina con respecto a la población control. Estas circunstancias pudieran constituir un riesgo añadido a éstos pacientes de daño por radicales libres.

Abstract

Background: Many of the degenerative changes observed in patients with Down's syndrome (DS) have been associated with the pathological effects of free radicals, and for this reason it is of interest to determine the levels present in these patients of powerful antioxidant molecules such as melatonin with important neuroprotector and neurotoxic consequences.

Patients and Methods: A study was made of 15 children with DS, together with a control group of 15 non-DS children, matched for age and sex. Serum melatonin was analyzed by RIA during periods of light and darkness and tryptophan metabolites (kynurenine pathway) by thin-layer chromatography.

Results: Differences were as per statistics significant in the night and day levels of melatonin of both groups, at a clearly low level in the group of SD. Differences were as per statistics significant in the night and day levels of tryptophan metabolites.

Conclusions: Although the children with SD preserve a secretion rhythm circadian of, patients with DS present levels of plasma melatonin lower than the corresponding levels in the control population. These circumstances constitute an added risk to these patients of damage by free radicals.

Keywords

Down's syndrome, melatonin, kynurenine, tryptophan, secretion rhythm circadian

INTRODUCCIÓN

La cronobiología es una disciplina de la fisiología que estudia los ritmos biológicos incidiendo tanto en su origen como en sus características y sus implicaciones; dentro de este campo, se denomina biorritmo (1), al movimiento uniforme (ritmo) de una actividad vital. Las oscilaciones de los niveles con relación al tiempo dan lugar a la distinción de varios tipos de biorritmos. El ritmo circadiano es el que está acoplado a la alternancia de luz-oscuridad.

En los humanos, la glándula pineal se sitúa en el centro del cerebro, detrás del tercer ventrículo y está constituida por dos tipos de células: los pinealocitos productores de indolaminas (principalmente melatonina) y péptidos (como la arginina vasotocina) y las células neurogliales. La glándula pineal de los mamíferos es un transductor neuroendocrino, que transforma la información lumínica que llega desde la retina al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, en melatonina. La síntesis y liberación de melatonina son estimuladas por la oscuridad e inhibidas por la luz. Con el comienzo de la oscuridad, la actividad del enzima N-acetiltransferasa que regula la síntesis de melatonina se incrementa, iniciándose la síntesis y liberación de melatonina, que va a alcanzar su pico hacia la mitad de la noche (2-4 horas de la madrugada), cayendo posteriormente durante la segunda mitad de la noche. Considerando la secreción de melatonina con la edad, observamos que en los lactantes menores de 3 meses, es muy escasa. En los lactancia tardía la secreción de melatonina aumenta y se hace circadiana, de forma que los picos nocturnos son máximos a la edad de 1 a 3 años y posteriormente decrecen de forma gradual (2)

El Síndrome de Down (SD) es la cromosomopatía humana más importante por varios motivos. Por ser la más

frecuente, por ser la primera causa de retraso mental y por ser la mejor conocida. Podría definirse como el conjunto de rasgos físicos y psíquicos que resultan en el ser humano como consecuencia de un desequilibrio en el material genético que altera el programa normal de desarrollo y crecimiento.

La primera referencia escrita sobre este síndrome data de 1846, cuando SÉGUIN describe un grupo específico de individuos con retraso mental, claramente identificables del resto por sus rasgos faciales, denominando la enfermedad "*furfuraceous idiocy*" (3). Veinte años después, JOHN LANGDON H. DOWN redescubre más ampliamente el síndrome clínico al que llamaría "*Mongolian idiocy*" (4). Desde entonces, los conocimientos acerca de este síndrome han ido creciendo en progresión geométrica, pero hasta 1959 no se conoció su mecanismo genético. LEJEUNE demostró que las personas con SD tenían un cromosoma acrocéntrico de más y, por lo tanto, su dotación era de 47 cromosomas en lugar de 46 (5). En la actualidad los progresos en genética molecular y el desarrollo de nuevas técnicas citogenéticas, están permitiendo una progresiva aproximación al conocimiento de la patogenia, están aportando nuevas posibilidades diagnósticas, están facilitando la profilaxis y quizás en un futuro no muy lejano posibiliten algún tipo de tratamiento.

De la revisión exhaustiva de la bibliografía se deduce que después de 1980 se han efectuado muy pocas investigaciones sobre trastornos metabólicos en el síndrome de Down. Muchos de los estudios efectuados con anterioridad a dicho año estaban en relación con la farmacología del 5-hidroxi-triptófano, precursor de la serotonina que se utilizaba entonces para mejorar ciertos síntomas en los niños con SD y hoy totalmente abandonado (6). No se conoce ninguna alteración metabólica totalmente específica o patognomónica del SD.

La melatonina es un componente destacado del sistema de defensa antioxidativa (7)(8). La superóxido dismutasa (SOD-1) es una enzima limpiadora en el sistema antioxidante. La actividad de la SOD-1 está aumentada 1,5 veces en todas las células con trisomía 21. Como efecto secundario hay un aumento de la concentración de superóxido en los polimorfos nucleares, y como efecto inmediato derivado de lo anterior hay un aumento de la actividad de glutatión-peroxidasa, sin que se modifique la actividad catalasa. Por otro lado, se produce un aumento de la peroxidación lipídica de cerebros fibroblastos fetales, lo cual podría explicar en parte la demencia presenil en las personas con SD. El aumento de actividad SOD-1 podría inducir también la disminución de los niveles de neurotransmisores como la serotonina.

La alteración del metabolismo del triptófano en personas con SD fue descrita por primera vez en 1958, publicándose desde entonces numerosos trabajos (9). El hallazgo más constante ha sido la alteración del metabolismo del triptófano en la vía de la serotonina: varios autores ha señalado niveles bajos de serotonina en sangre, y en plaquetas, así como una eliminación disminuida del principal catabolito de la serotonina: el ácido 5-hidroxi-indol-acético. El hecho de que este principal catabolito de la serotonina muestra en líquido cefalorraquídeo una menor concentración en personas con SD, hizo pensar que al igual que en la sangre, existiría un nivel bajo de serotonina cerebral, que contribuiría a la alteración de la función cerebral.

Nuestro grupo, demostró la presencia de secreción rítmica en el cordón umbilical de recién nacidos normales(10), demostrando posteriormente que ésta era inducida por la madre (11), aunque los primeros días tras el nacimiento son especialmente intensos en la producción de melatonina, en

cambio la aparición de una secreción rítmica estable es posterior. En este orden de ideas, sería interesante seguir a un grupo de recién nacidos con SD para analizar cuando aparece y cómo es el ritmo de melatonina. Existe un ritmo de secreción de melatonina de tipo endógeno, sobre el que la luz tiene dos efectos: los ciclos luz-oscuridad modifican el ritmo de su secreción y breves pulsos de luz de suficiente intensidad y duración suprimen bruscamente en el hígado la 6-hidroxi-melatonina, y después de una conjugación con ácido glucurónico o sulfúrico, es excretada en la orina. La excreción urinaria de 6-sulfatoxi-melatonina, principal metabolito de la melatonina, guarda una estrecha correlación con la concentración de melatonina sérica.

Nos planteamos estudiar la variación circadiana de melatonina y metabolitos del triptófano por la vía de la Kinurenina en niños normales y con síndrome de Down.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se seleccionaron dos grupos:

Un grupo de niños controles de referencia. Dicho grupo fue seleccionado entre los pacientes que por causas transitorias y/o banales hubieron de ser ingresados en el Departamento de Pediatría del Hospital Universitario de Granada. Este grupo estuvo constituido por 15 niños, los cuales reunían las siguientes criterios de inclusión (Tabla I):

Ausencia entre los antecedentes familiares de enfermedades hereditarias.

Ausencia en la historia personal de enfermedades orgánicas conocidas, a excepción de las enfermedades propias de la infancia, las cuales siguieron un curso evolutivo favorable.

Haber sido ingresados por patologías de carácter leve o moderado para observación o tratamiento hospitalario, siendo seleccionados para nuestro estudio una vez estabilizada la situación clínica del paciente y antes del alta hospitalaria con el fin de lograr la normalidad clínica y analítica.

Un grupo de pacientes con Síndrome de Down. De un total de 46 personas censadas por la Asociación Síndrome de Down de la Serranía de Ronda en el área geográfica de la Serranía de Ronda, 22 de ellas (47,8%) eran niños menores de 14 años, a los que mediante carta personal se les ofreció la posibilidad de ser incluidos en el Programa de Salud para niños con síndrome de Down. Siendo rechazado por siete de ellos, con lo que el grupo problema consta de 15 niños con SD menores de 14 años (Tabla II)

Se excluyeron aquellos niños cuyos padres o tutores no firmaron el consentimiento informado y aquellos que tuvieran 14 o más años.

MÉTODO

La determinación y medición de la variable melatonina se realizó mediante la técnica de radioinmunoensayo.

Los metabolitos del triptófano vía de la kynurenina se determinaron por cromatografía con capa fina de COPPINI y BENASSI, modificada por NARBONA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Medidas de centralización: media aritmética, mediana.
- Medidas de dispersión: Desviación típica, coeficiente de variación.
- Medidas de forma: sesgo, asimetría y curtosis
- Test de comparación de dos medias para valores apareados.

RESULTADOS

En este análisis se comparan datos pertenecientes a la misma variable en los mismos individuos (determinaciones diurnas y nocturnas) empleando un test de comparación de medias para valores apareados, para valorar si dichas variables presentan un ritmo circadiano en sus niveles diurnos y nocturnos.

Tabla 1. Características clínicas más relevantes del grupo control.

Caso nº	Edad (meses)	Sexo	Peso (g)	Diagnóstico
1	158	m	46000	Otitis serosa
2	108	m	28000	I.R.A.
3	80	f	25600	Dermatitis
4	84	f	20500	Gastritis aguda
5	78	m	21500	G.E.A.
6	36	f	12000	G.E.A.
7	60	m	18200	Gastritis aguda
8	30	f	14000	Estomatitis
9	24	f	11000	G.E.A.
10	23	m	12500	Bronconeumonía
11	3	m	5800	Vómitos
12	15	f	12800	I.Q. (menor)
13	48	m	13000	Intoxicación leve
14	48	m	19600	Bronquitis
15	36	f	11600	Gastritis aguda

Tabla 2. Características clínica más relevantes del grupo de niños con SD.

Caso nº	Edad (meses)	Sexo	Peso	Patología significativa
1	24	m	11960	No
2	15	m	10110	No
3	32	m	11500	Distireosis
4	106	f	20000	No
5	42	m	13670	No
6	84	f	18200	C.I.V.
7	84	f	25700	No
8	90	f	15400	Ferropenia
9	30	f	9495	No
10	138	m	37700	No
11	78	f	20000	No
12	108	m	26000	No
13	36	m	12900	Leucemia
14	0.5	m	1800	(LLA)
15	159	f	42700	No

Tabla 3. Comparación de medias de los valores diurnos y nocturnos melatonina del grupo control.

	X1	X2	D.M.	E.E.	T exp	p
Melatonina	31.46	75.26	-43.8	6.7	-6.53	***
Kynurenina	5.64	4.24	1.4	0.25	5.63	***
3-OH-kynurenina	14.20	9.24	4.96	0.73	6.70	***
Ác. Kynurénico	17.63	13.99	3.64	0.81	4.46	***
Ác. Xanturénico	13.66	10.25	3.40	0.52	6.52	***
Ác. antranílico	2.09	2.12	-0.02	0.04	-0.65	N.S.

Obviamente hay que distinguir dos situaciones distintas:

a) Grupo control /valores diurnos /nocturnos. En la tabla III pueden verse los datos referentes a la comparación de medias de los valores diurnos y nocturnos de las variables del grupo control.

El análisis comparativo realizado con las tasas plasmáticas de melatonina para valorar si existe o no variación circadiana en el grupo control, ofreció un valor de t exp de -6.53 y en consecuencia, como se puede apreciar en la tabla y figura se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

Kynurenina. Con relación al metabolito principal de esta vía metabólica del triptófano, encontramos igualmente un a valor de texp de 5.63, con una mauro y significativa eliminación diurna, con un valor de $p < 0.001$.

3-OH-kynurenina. En este caso y como sucedió con el metabolito principal, la tasa de eliminación diurna supera la producción nocturna de una manera altamente significativa.

Ácido kynurénico: Sigue el mismo patrón circadiano de excreción urinaria que los metabolitos que la preceden.

Ácido xanturénico. Este metabolito de la vía alternativa siguió el mismo patrón excretor de los anteriores, con una disminución de sus tasas de excreción durante el período oscuro, con diferencias significativas ($p < 0.001$).

Ácido antranílico. Los patrones de eliminación de este último metabolito de la vía alternativa fueron muy similares con cifras de 2.09 y 2.12 respectivamente, lo que viene a corroborar que el mantenimiento de patrones circadianos es un tema de adaptación endocrino-metabólica sujeto a múltiples variaciones tanto ambientales como internas.

b) Grupo Down. Valores diurnos /nocturnos.

Melatonina: Con relación al grupo de Down, como se puede ver en la tabla IV, en el análisis de variaciones circadianas de la melatonina, si bien mostraron valores de normalidad como se pueden observar en la tabla y figura, con claros incrementos durante la noche, con un valor de t exp de 6.14 y $p < 0.001$, hay que notar que comparativamente la tasa de producción hormonal es claramente inferior al grupo control.

Kynurenina. Se podría decir que la tasa de eliminación urinaria del metabolito principal de esta vía metabólica del triptófano sigue una imagen especular pero inversa a la de la melatonina. Por un lado, hemos encontrado una variación circadiana significativa ($p < 0.001$) y por otro lado, una disminución sustancial con relación al grupo control de la cantidad de este metabolito eliminado. En cierto modo, esto apunta a que en el SD se producen importantes y significativas modificaciones en la metabolización del triptófano.

3-OH-kynurenina. Igualmente, la tasa de eliminación durante las horas diurnas supera de manera significativa a las producción nocturna, con diferencias altamente significativas.

Ácido kynurénico. Se encontraron hechos diferentes al resto de los metabolitos. Por un lado, se ha mantenido el patrón de eliminación circadiana con un valor de texp 5.77, $p < 0.001$ y por otra, una

elevación cuantitativa de tal magnitud que se alcanzaron valores cuatro veces más altos, tanto durante el día como durante la noche, que los correspondientes al grupo control.

Tabla 4. Comparación de medias de los valores diurnos y nocturnos de melatonina del grupo Down.

	X1	X2	D.M.	E.E.	T exp	
Melatonina	22.4	38.46	-	2.61	-	***
Kynurenina	3.90	3.08	16.06	0.17	6.14	***
3-OH-kynurenina	15.45	11.18	0.82	0.50	4.60	***
Ác. Kynurénico	80.84	58.26	4.27	3.90	8.52	***
Ác. Xanturénico	9.80	9.10	0.7	0.83	5.77	N.S.
Ác. antranílico	10.95	7.2	0.7	1.40	0.84	***
			3.74		2.67	

Ácido xanturénico. Nuevamente volvemos a encontrar otro dato diferencial entre los niños afectados de SD como es la desaparición del patrón de eliminación circadiana propia de los niños normales.

Ácido antranílico. En cambio, este último metabolito, probablemente como consecuencia de los cambios experimentados por los metabolitos precedentes, y a diferencia del grupo control, nuevamente encontramos un patrón de eliminación circadiano, con una t exp de 2.67 y p <0.05

DISCUSIÓN

Es llamativa la ausencia de trabajos que estudien la vía de la melatonina en sujetos con SD. Hemos encontrado un estudio que refiere diferencias en la eliminación urinaria de 24 horas del principal metabolito de la melatonina, la 6-hidroxi-melatonina, entre 12 sujetos con SD y 8 sujetos control que eran padres o hermanos de los casos (12). En una publicación reciente por nuestro grupo de investigación (13) se ha encontrado diferencias significativas entre los niveles en sangre de melatonina, serotonina y beta endorfinas entre un grupo control de 15 niños menores de 14 años y 15 niños con síndrome de Down menores de 14

años, con niveles inferiores en el grupo con síndrome de Down, tanto en las horas diurnas como en las nocturnas.

En nuestro trabajo hemos podido comprobar como los niños con SD, a pesar de que producen significativamente menos melatonina, conservan el ritmo circadiano de melatonina (tabla IV y figura 2) y los metabolitos también siguen un ritmo de producción de acuerdo al patrón circadiano. En este sentido REITER y cols (14) profundizaron algo más al estudiar casos individuales con varias determinaciones en el transcurso del día, encontrando que la mayoría de las personas con SD estudiadas mantenían un ritmo de secreción en la producción de melatonina.

Con respecto a los metabolitos del triptófano vía de la Kynurenina, se podría decir que la tasa de eliminación urinaria del metabolito principal de esta vía metabólica del triptófano sigue una imagen especular pero inversa a la de la melatonina. Por un lado, hemos encontrado una variación circadiana significativa (p<0.001) y por otro lado, una disminución sustancial con relación al grupo control de la cantidad de este metabolito eliminado. En cierto modo, esto apunta a que en el SD se producen importantes y significativas modificaciones en la metabolización del triptófano.

REITER y cols (14) en un estudio de excreción urinaria del principal metabolito de la melatonina, la 6-hidroxi-melatonina sulfato en períodos de 24 hora en 12 sujetos con SD y 8 controles familiares sanos, encuentran que todos los controles y 10 de los 12 sujetos con SD exhibían una excreción normal con los habituales niveles bajos diurnos y elevados nocturnos, mientras que los dos casos restantes no exhibían ritmo. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las medias, ni entre las variaciones rítmicas de las medias de los grupos de personas con SD y los controles, lo cual implica que los

mecanismos neuroendocrinos que gobiernan la producción circadiana de melatonina, están preservados en los sujetos con SD. En consecuencia, creemos que nos encontramos nuevamente en un punto crucial de los trastornos íntimos que acontecen en el SD, de tal manera que deberá profundizarse más en su conocimiento porque estamos convencidos que el defecto génico en primer lugar, y sus consecuencias (enzimáticas (superóxido dismutasa) y hormonales (melatonina) posteriormente) son eslabones de un proceso que da lugar a algunas características clínicas del síndrome.

Nuestros resultados coinciden con los de REITER, ya que constatamos en el grupo con SD la existencia de un ritmo circadiano de secreción de melatonina si bien con niveles más bajos que en el grupo control, tanto durante las horas diurnas como durante las nocturnas.

REFERENCIAS

1. Bueno Sánchez M: Los biorritmos en Pediatría. Rev Esp Pediatr 1984, 40: 1-10
2. Bruzezinski A: Melatonin in humans. N Eng J Med 1997, 336: 186-195.
3. Seguin E: Le traitement moral, l'hygiene et l'education des idiots. Paris: JB Ballière 1946.
4. Langdon-Down J: Observations on an ethnic clasification of idiots. London Clinical Lectures and Reports 1866, 3: 259-262.
5. Lejeune J: Le mongolisme, maladie chromosomique. Nature 1959, 3296: 521-523.
6. Patterson D. Genetic mapping in chromosome 21 and its implications for Down's syndorme and other diseases. Somatic Cell Genet 1987, 13: 365-371
7. Chang HM, Huang YL, Lan CT, Wu UI, Hu ME, Youn Se. Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. J Pineal Res 2008; 44: 172-180.
8. Cabrera J, Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Sainz RM, Mayo IC, et al. Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. Neuropharmacology 2000; 39: 507-514.
9. Jerome H, Lejeune J, Turpin R. [Study of the urinary excretion of some tryptophan metabolites in mongoloid children.] C R Hebd Seances Acad Sci 1960; 251: 474-476.
10. Muñoz A, Rodríguez T et al: Evaluation of pineal function (aMT levels) in normal and preterms newborns with acute fetal distress. J Endocrinol 1993, 129: 442-445.
11. Jaldo Alba F, Muñoz Hoyos A et al: Light deprivation increases plasma levels of melatonin during the first 72 hours of life in human infants. Acta Endocrinol 1993, 129: 442-445.
12. Ballesta F: Correlaciones clínico-citogenéticas en el síndrome de Down. Síndrome de Down, Artículos y Resúmenes Científicos 1989, 5:1-6
13. Uberos J, Romero J, Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A. Melatonin and elimination of kynurenines in children with Down's syndrome. J Pediatr Endocrinol Metab, March 1, 2010; 23(3): 77-82.
14. Reiter RJ, Barlow-Walden L. et al. Twenty-four hour urinary excretion of 6-hydroxymelatonin sulfate in Down Syndrome subjects. J Pineal Res 1996, 20: 45-50.