

11233



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA
Y NEUROCIRUGÍA
"MANUEL VELASCO SUÁREZ"**

**DETERMINACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN LCR
DE PACIENTES CON SISTEMA EXTERNO DE DERIVACIÓN DE
LCR. SU UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
MENINGITIS ASÉPTICA VS. BACTERIANA.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO ESPECIALISTA EN
NEUROLOGÍA**

PRESENTA:

DRA. ELVIRA CASTRO MARTÍNEZ



INN

**TUTOR:
DR. JOSÉ LUIS SOTO HERNÁNDEZ**

MÉXICO, D.F.

2005

m 342455



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ**



SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

Dr. Julio Sotelo Morales

Director General

Dr. Manuel Velasco Suárez †

Director Emérito

Dr. Alfredo Gómez Aviña

Director Médico

Dra. Teresa Corona Vázquez
Directora de Enseñanza



INSTITUTO NACIONAL
DE NEUROLOGIA Y
NEUROCIROGIA
DIRECCION DE ENSEÑANZA

Dr. Fernando Zermeño Pöhls
Subdirección de Neurología

Dr. José Luis Soto Hernández
Jefe del Departamento de Infectología

TÉSIS DE NEUROLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

Determinación de biosíntesis de óxido nítrico en LCR de pacientes con sistema externo de derivación de LCR. Su utilidad en el diagnóstico diferencial de meningitis aséptica vs. bacteriana.

AUTOR

Dra. Elvira Castro Martínez

INSTITUCIÓN

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

TUTOR

Dr. José Luis Soto Hernández

Infectología, INNNMVS

CO-AUTORES

Q.F.B. Iván Pérez Neri

Neuroquímica, INNNMVS

M.V.Z. Antonio Bueno Nava

Neuroquímica, INNNMVS

Dr. Sergio Montes López

Neuroquímica, INNNMVS

Dr. José Angel Félix Torrónregui

Neurocirugía, INNNMVS

Dr. José Santos Zambrano

Neurología, Urgencias, INNNMVS

A las personas
que quiero.
Imposible nombrar a todas
en éste pequeño espacio.

*El fuego mismo de los dioses día y noche nos
empuja a seguir adelante.
Ven. Miremos los espacios abiertos.
Busquemos lo que nos pertenece por lejano que esté.*

Hölderlin

ÍNDICE

I.	Introducción	1
II.	Antecedentes	3
III.	Pregunta de investigación	6
IV.	Hipótesis	6
V.	Justificación	7
VI.	Objetivos	8
VII.	Material y método	8
	a. Pacientes	8
	b. Criterios de inclusión	8
	c. Criterios de exclusión	9
	d. Método	9
	e. Recolección de datos	12
	f. Análisis estadístico	13
VIII.	Resultados	13
IX.	Discusión	19
	a. Conclusiones	
X.	Anexos	24
	a. Hoja de recolección de datos y escalas aplicadas	
XI.	Bibliografía	25

I. INTRODUCCIÓN

En pacientes sometidos a neurocirugía se observan con frecuencia cambios en la composición del líquido cefalorraquídeo (LCR) con diferentes grados de pleocitosis. Estas alteraciones inflamatorias del LCR pueden ser el resultado de enfermedades cerebrales subyacentes, consecuencia del procedimiento neuroquirúrgico mismo (meningitis aséptica), o de infecciones bacterianas del sistema nervioso central. En este contexto, las características clínicas y variables del LCR son a menudo difíciles de evaluar y pueden no ayudar a distinguir meningitis bacteriana de meningitis aséptica, o cuando lo hacen, en ocasiones, suele ser tardíamente ⁽¹⁻⁵⁾.

Las infecciones bacterianas que ocurren después de procedimientos neuroquirúrgicos son causadas por una amplia variedad de microorganismos. Los gérmenes de adquisición intrahospitalaria son usualmente diferentes y a menudo más virulentos que las bacterias asociadas con infecciones del sistema nervioso adquiridas en la comunidad.

La meningitis postoperatoria ocurre en 0.5% a 0.7% de los procedimientos neuroquirúrgicos y con mayor frecuencia es causada por *Staphylococcus aureus* o bacilos Gram negativos. Las infecciones son más comunes después de la colocación de sistemas de derivación del LCR.

El diagnóstico de meningitis bacteriana está basado en las características clínicas, de laboratorio y, en algunos casos en hallazgos radiológicos. Los pacientes usualmente presentan ataque al estado general, fiebre, cefalea, signos meníngeos y algunos alteración de las funciones mentales. Usualmente existe leucocitosis periférica. El análisis de LCR revela un conteo elevado de células blancas con predominio de leucocitos

polimorfonucleares, alto nivel de proteínas, bajo nivel de glucosa, y tinción de Gram positiva en la mayoría de los casos. Una tomografía computada con contraste puede revelar reforzamiento anormal de las meninges.

Los lipopolisacáridos que forman la pared celular de varios microorganismos que causan meningitis postoperatoria como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son estimulantes potentes para la liberación de citocinas periféricamente y en el SNC ^(6,7); asimismo, ocurre síntesis y liberación de ON, radical libre que tiene varias funciones importantes en el SNC como mediador de procesos fisiológicos y patológicos. En el contexto de nuestro estudio, es importante mencionar su influencia en los procesos de infección bacteriana posterior a procedimientos neuroquirúrgicos meritorios de sistema externo de derivación de LCR, ya que son estos pacientes quienes tienen un incremento potencial de infección del SNC por el procedimiento mismo, lo que puede resultar en meningitis subdiagnosticada y no tratada oportunamente cuando la etiología bacteriana está presente. El estándar para el diagnóstico de certeza de meningitis bacteriana postoperatoria es el cultivo de un germen patógeno en LCR acorde con un cuadro clínico compatible y un estudio citoquímico de LCR anormal. El tiempo para el desarrollo del germen, su identificación y la realización de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos es variable pero puede tomar entre 48 y 72 horas y un diagnóstico más temprano de meningitis postoperatoria puede reducir la morbilidad y mejorar el pronóstico. Por esta razón se considera que es deseable contar con marcadores diagnósticos adicionales en éste grupo de pacientes, por lo que en éste estudio se hicieron determinaciones de

biosíntesis de ON (arginina, citrulina, relación arginina/citrulina y nitratos) para su uso como indicadores potenciales de infección bacteriana en LCR después de procedimientos neuroquirúrgicos.

II. ANTECEDENTES

El ON es un radical libre que está implicado en muchas funciones biológicas importantes ⁽⁸⁾. Como testimonio de la rápida expansión en el conocimiento de sus múltiples papeles biológicos, después de su descubrimiento en 1987, fue nombrada molécula del año en 1992.

El ON es producido a partir de L-arginina (arginina) clasificada como aminoácido semi-esencial. ON es formado entonces a partir de un átomo guanidino nitrogenado de la arginina. El guanidino nitrogenado acepta cinco electrones en un proceso de oxidación que requiere oxígeno molecular, resultando en la formación de **ON** y **citrulina**.

En esta conversión participa la **sintasa de óxido nítrico (NOS)**, enzima flavoproteica homodimérica (130-150 subunidades kDA), siendo requeridos además cofactores como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), tetrahidrobiopterina (BH₄), flavin adenindinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN), oxígeno (O₂) y protoporfirina IX ^(9,10).

La reacción catalítica incluye dos pasos de mono-oxigenación; inicialmente, L-arginina es hidroxilada por O₂ y NADPH a la forma N^ω-hidroxi-L-arginina. Subsecuentemente,

N^o-hidroxi-L-arginina es oxidada a L-citrulina y ON. El ON es entonces producido por la acción de la NOS en células endoteliales, neuronas, astrocitos y macrófagos ⁽¹¹⁾. La enzima NOS existe en tres isoformas ⁽¹²⁾.

La NOS tipo I (NOS-1), o NOS neuronal (nNOS), es calcio dependiente y fue originalmente descubierta en las neuronas, se encuentra también en ciertas células epiteliales. La NOS tipo II (NOS-2) es también conocida como NOS inducible (iNOS), es calcio independiente; se encuentra principalmente en macrófagos, hepatocitos y astrocitos -éstos últimos contienen la más alta concentración del precursor L-arginina ⁽¹³⁾- donde su expresión puede ser inducida por LPS y citocinas. La NOS tipo III (NOS-3) o NOS endotelial (eNOS), calcio dependiente, fue inicialmente identificada como la enzima que produce el factor relajante derivado del endotelio (FRDE).

Ambas, NOS-1 y NOS-3 son a menudo agrupadas juntas como NOS constitutiva (cNOS) y producen pequeñas cantidades de ON y su actividad está regulada por Calcio. Por otra parte, NOS-2 no es expresada en células en reposo pero sí inducida por endotoxinas, citocinas proinflamatorias, incluyendo interleucina-1, interferón gamma (IFN γ), y factor de necrosis tumoral alfa (FNT α). La NOS-2 depende de calmodulina y las concentraciones de calcio intracelular. NOS-2 produce altos niveles de ON comparados con NOS-1 o NOS-3. Bajos niveles de ON producido por cNOS son responsables de los efectos fisiológicos (regulación del tono vascular) y las elevadas cantidades de ON producido por iNOS están asociadas con los efectos patológicos ^(9,14-15).

Como se ha señalado, el ON es producido durante la conversión directa de arginina a citrulina. Después es rápidamente metabolizado, principalmente a nitrito/nitrato. y

finalmente excretado como nitrato urinario ⁽¹⁶⁾. Desde que se ha determinado que el ON es inestable con una vida media de segundos, nitrito/nitrato urinario y en plasma han sido medidos frecuentemente como indicadores de la producción de ON, en muchos casos, en relación con procesos infecciosos sistémicos; también se han medido nitritos, nitratos como metabolitos estables del ON en LCR de pacientes con enfermedades neurodegenerativas ^(17,18) y en pacientes con meningitis ⁽¹⁹⁾ como lo señala el estudio de Milstien y colaboradores quienes mostraron que nitritos y nitratos en LCR estaban incrementados, especulando que la ruptura de la barrera hematoencefálica podía contribuir a éste incremento ^(18,20).

También se ha supuesto que indicadores del ON como arginina y citrulina, relacionadas con la enzima NOS cuya actividad puede ser inducida por los LPS ⁽²¹⁻²³⁾ de la cápsula de microorganismos causantes de meningitis postoperatoria puedan resultar elevados en neuroinfección bacteriana, sin embargo, no hay suficientes estudios al respecto que sustenten dicha aseveración.

Así, los resultados de un gran número de estudios han implicado la elevación de ON en la patogénesis de varias enfermedades del SNC tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, encefalitis por VIH o enfermedad de Parkinson, entre otras ⁽²⁴⁻²⁷⁾.

Por lo tanto, considerando que determinaciones cuantitativas del precursor arginina y su conversión a citrulina, relación arginina/citrulina, así como los productos de degradación del ON (nitratos) producidos durante meningitis bacteriana postquirúrgica en pacientes neuroquirúrgicos con sistemas externos de derivación de LCR no han sido realizadas, en

el presente estudio se realizarán dichas determinaciones para el diagnóstico diferencial de meningitis aséptica vs. bacteriana, especulando que la biosíntesis del mediador inflamatorio ON se ve incrementada intratecalmente tras la influencia bacteriana.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es de utilidad la determinación de biosíntesis de Oxido Nítrico en LCR para el diagnóstico diferencial de meningitis aséptica vs. meningitis bacteriana postoperatorias en pacientes con sistemas externos de derivación de LCR?

IV. HIPÓTESIS

H0. La determinación de biosíntesis de óxido nítrico en LCR no es útil para el diagnóstico diferencial de meningitis aséptica vs. meningitis bacteriana postoperatorias en pacientes con sistema externo de derivación de LCR.

H1. La determinación de biosíntesis de óxido nítrico en LCR es útil para el diagnóstico diferencial de meningitis aséptica vs. meningitis bacteriana postoperatorias en pacientes con sistema externo de derivación de LCR.

V. JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con sistemas externos de derivación de LCR del tipo drenaje ventricular externo (DVE) o drenaje subaracnoideo lumbar (DSA) tienen un alto riesgo de infección; para vigilar esta posibilidad se toman cada 24 a 48 horas muestras de LCR para citoquímico y cultivo. Cuando el cultivo es positivo nos da una información “tardía” (48-72 horas), considerando además, que la cuenta leucocitaria y otras citocinas proinflamatorias en LCR tienen baja sensibilidad y especificidad ⁽⁵⁾ respecto a neuroinfección en pacientes postquirúrgicos. Se explora la posibilidad de que otros marcadores bioquímicos pudieran indicar tempranamente la presencia de infección y lo hicieran independientemente de la presencia de hemorragia, tumor o procedimiento quirúrgico y de la repercusión que estos procesos tuvieran en el LCR. Se espera que las concentraciones de los marcadores de biosíntesis de óxido nítrico analizados resulten elevadas y sugieran que diferentes enfermedades o procedimientos neuroquirúrgicos pueden inducir dicha elevación, pero que las neuroinfecciones inducen su más alta síntesis y liberación y que podrían ser empleadas como marcadores diagnósticos de infección temprana del LCR en pacientes neuroquirúrgicos y, que una baja concentración de estos marcadores en LCR con un cultivo de LCR negativo puedan apoyar el retiro de terapia antimicrobiana empírica o ayudar a dirigirla de manera más apropiada hacia otro posible foco, reduciendo los efectos adversos y la presencia de microorganismos multiresistentes, mejorando así costos y eficacia.

VI. OBJETIVO

Evaluar si las concentraciones de arginina, citrulina y nitratos en LCR de pacientes neuroquirúrgicos con sistema externo de derivación de LCR pueden ser utilizadas como herramientas para el diagnóstico diferencial temprano de meningitis aséptica vs. meningitis bacteriana postquirúrgica.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

PACIENTES

Se trató de un estudio piloto, longitudinal, observacional de un grupo de pacientes postoperados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el periodo del 1° de Diciembre de 2003 al 31 de Diciembre de 2004 por EVC hemorrágica hipertensiva con irrupción ventricular ó hemorragia subaracnoidea con DVE o con DSA lumbar instalado por fistula de LCR; hospitalizados en urgencias, neurocirugía, unidad de cuidados intermedios y unidad de cuidados intensivos. El Comité de Investigaciones Clínicas de nuestra institución aprobó el protocolo del estudio.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes de 18 a 65 años de edad
2. De ambos sexos
3. Pacientes en el postoperatorio inmediato de colocación de DVE por EVC

4. En quienes se previó la permanencia del DVE por un mínimo de 5 días
5. Pacientes con fistula de LCR en quienes se instala un DSA lumbar
6. Permanencia mínima del DSA lumbar de 5 días
7. Sin evidencia clínica y de laboratorio de sepsis o infección del SNC (con un cultivo de LCR inicial negativo) a su ingreso al estudio, pero con el riesgo de esta por el procedimiento mismo
8. Con expectativa de vida mayor de 5 días

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes con infección del SNC documentada al inicio del estudio
2. Permanencia del DVE o DSA lumbar menor a 5 días
3. Pacientes con extracción accidental del DVE o DSA lumbar
4. Pacientes cuya condición requiera procedimientos de urgencia y se realicen fuera de quirófano
5. Pacientes que por resangrado u otra condición fallezcan en una estancia menor a 5 días
6. Pacientes que se trasladen antes del seguimiento

MÉTODO

Los pacientes incluidos se siguieron longitudinalmente y se obtuvieron muestras de LCR del sistema de derivación de LCR correspondiente (DVE o DSA lumbar) a intervalos preestablecidos (1,3 y 5 días). Se envió muestra de LCR al laboratorio para los análisis de

rutina (estudio citoquímico, tinciones y cultivo) y una alícuota simultánea de LCR fue almacenada a -80°C (-112°F) en tubos de plástico hasta la determinación de arginina, citrulina, relación arginina/citrulina y nitratos, para finalmente realizar el análisis de resultados comparando las diferencias entre los que desarrollaron infección y los que no. Las mediciones de biosíntesis de óxido nítrico se realizaron mediante *Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa*.

Arginina-Citrulina:

Procesamiento de las muestras:

100 μl de muestra se desproteinizan con un volumen igual de metanol absoluto grado HPLC. Se centrifugan 15 minutos a 15000 rpm a 5°C . El sobrenadante se diluye 1:10 y 100 μl del sobrenadante diluido se hacen reaccionar por 1 minuto en un vortex con un volumen igual del reactivo de OPA/ME (se prepara de la siguiente manera: 25 mg de o-ftalaldehído se disuelven en 625 μl de metanol absoluto, se agregan 5.6 ml de amortiguador de boratos pH=9.5; se agregan 25 μl de mercaptoetanol). La mezcla de reacción se inyecta inmediatamente al cromatógrafo.

Equipo:

Las muestras se analizan en un cromatógrafo compuesto por una bomba binaria Perkin Elmer Serie LC200 equipada con un loop de 20 μl de volumen, un detector de fluorescencia Beckman Modelo 157 y una columna Adsorbosphere OPA HS (C18, 5 micras de diámetro de partícula, 4.6x100 mm, Alltech). Las señales se analizan con un integrador HP 3396, Serie II.

Condiciones cromatográficas:

La cromatografía se realiza por gradiente utilizando como disolvente A metanol absoluto grado HPLC y como disolvente B un amortiguador de acetatos 50 mM pH = 5.9 con 1.5 % (v/v) de tetrahidrofurano grado HPLC. El programa utilizado consiste en un gradiente lineal de 10% A a 35% A en 15 minutos, seguido de 5 minutos de lavado con 99% A, posteriormente 5 minutos de reequilibrio a 10% A, con un flujo constante de 1.5 mL/min.

Nitratos:

Procesamiento de las muestras:

100 µlitros de la muestra se desproteinizan con un volumen igual de metanol absoluto grado HPLC. Se centrifugan por 15 min a 15000 rpm a 5°C. El sobrenadante se diluye 1:10 y se inyecta al cromatógrafo.

Equipo:

Las muestras se analizan con un cromatógrafo equipado con una bomba isocrática Perkin Elmer Serie LC250 equipada con un loop de 50 µlitros, una interfase PE Nelson Serie 900, una columna Lichrosorb (C18, 5 micras de diámetro de partícula, 4.6x250 mm, Alltech) y un detector UV/Vis Perkin Elmer Modelo LC-95 ajustado a 228 nm. Las señales se analizan con el software Turbochrom versión 4.1 de Perkin Elmer.

Condiciones Cromatográficas:

La cromatografía se realiza utilizando una solución de octilamina pH=6.1 como fase móvil a flujo constante de 1.2 ml/min.

RECOLECCIÓN DE DATOS Y SEGUIMIENTO

Se revisaron los registros médicos de los pacientes y se obtuvo la siguiente información: edad y género, diagnóstico de ingreso, fecha y tipo de sistema de derivación de LCR instalado (DVE o DSA lumbar); antecedente de infección.

Se registraron los síntomas y signos neurológicos y se aplicó la escala de coma de Glasgow al ingreso ⁽²⁸⁾ (GCS: Respuesta motora: 6, obedece; 5, localiza estímulos dolorosos; 4, respuesta de retirada; 3, respuesta flexora; 2, respuesta extensora y 1, respuesta ausente. Respuesta verbal: 5, orientado; 4, conversación confusa; 3, palabras inapropiadas; 2, sonidos ininteligibles y 1, respuesta ausente. Apertura ocular; 4, espontánea; 3, a la orden verbal; 2, al estímulo doloroso y 1, ausente).

De igual forma se incluyó la escala de egreso de Glasgow⁽²⁹⁾ (GOS: Glasgow Outcome Scale; 1, muerte; 2, estado vegetativo; 3, incapacidad severa con dependencia funcional; 4, incapacidad moderada con independencia aunque no regresa al trabajo o escuela; y 5 con buena recuperación) para la clasificación funcional al momento de su salida hospitalaria.

Durante su estancia y permanencia del sistema externo de derivación de LCR se registraron constantes corporales como temperatura; si existía condición de ayuno o dieta por alguna vía, administración concomitante de antibióticoterapia y esteroides.

Se registraron resultados de estudios paraclínicos en sangre y LCR obtenidos del laboratorio clínico y de infectología tales como cuenta leucocitaria en sangre, aspecto del LCR, número y tipo de células en LCR, proteinorraquia y glucorraquia; resultados de tinciones y cultivos en LCR de los días preestablecidos (1,3 y 5).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizó la distribución de los datos empleando medidas de tendencia central y dispersión.

Se describieron y analizaron las variables nominales mediante la prueba de χ^2 y prueba exacta de Fisher.

Las variables dimensionales fueron analizadas mediante la prueba *t* de student y U de Mann Whitney con un valor de $p < 0.05$ para significancia estadística e intervalo de confianza (IC) del 95%. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 10.0

VIII. RESULTADOS

Un total de 13 pacientes (7 mujeres y 6 hombres; edad promedio de 49 años en el grupo sin infección y 39 años en el grupo con neuroinfección; con un rango de edad de 26 a 76 años) postoperados de colocación de sistema externo de derivación de LCR fueron incluidos al presente reporte por contar con los criterios de inclusión establecidos

Para el análisis los pacientes fueron distribuidos en dos grupos, uno con neuroinfección bacteriana postquirúrgica y otro sin infección bacteriana. En el grupo sin infección los diagnósticos al ingreso fueron EVC hemorrágica hipertensiva en 4 pacientes, hemorragia subaracnoidea en 2 pacientes y 4 pacientes con fístula de LCR mientras que en el grupo con neuroinfección se tuvo un caso para cada uno de estos diagnósticos

Durante su estancia en el hospital la dieta fue administrada vía enteral o parenteral mientras que algunos pacientes se mantuvieron en ayuno. En el grupo sin infección 5 estuvieron en ayuno y 5 más con dieta en tanto que en el grupo con neuroinfección 2 pacientes tuvieron dieta y uno se mantuvo en ayuno.

De acuerdo al diagnóstico de ingreso, estado clínico e indicación terapéutica el tipo de sistema externo de derivación de LCR instalado correspondió a DVE en 6 pacientes y 4 DSA lumbares en el grupo de pacientes sin infección y de los 3 pacientes del grupo con neuroinfección 2 tuvieron DVE y uno DSA lumbar En ninguno de los grupos se encontró antecedente de cuadro infeccioso previo al neurológico.

En ambos grupos todos los pacientes tuvieron dentro de su esquema de tratamiento la administración de antibióticos del tipo β -lactámico, cefalosporina y politerapia antimicrobiana. De igual modo, esteroide (dexametasona).

Los puntajes en las escalas de ingreso y egreso (GCS y GOS) aplicadas variaron dependiendo del diagnóstico y estado clínico. De tal modo que 2 de los pacientes del grupo sin infección fallecieron, uno egresó en estado vegetativo, otro con incapacidad moderada y 6 tuvieron adecuada recuperación, en tanto que en el grupo con neuroinfección un paciente falleció y dos se recuperaron.

La estancia hospitalaria promedio fue de 27 días con un rango de 7 a 43 días.

En las variables anteriormente señaladas y en el resto de las características demográficas que se muestran en la **Tabla 1 y 2** no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Obtuvimos diferencia en el grupo con neuroinfección vs. sin infección en la variable temperatura, observándose diferencia de 1°C en el grupo con neuroinfección respecto a los no infectados, con una media de 37.26 y DE \pm 1.08 $p < 0.05$ (Tabla 2).

Tabla 1. Características demográficas				
Variable		%	Neuroinfección	
			NO ₁₀ (%)	SI ₃ (%)
Género	Femenino	54	4 (40)	3 (100)
	Masculino	46	6 (60)	-
Diagnóstico de Ingreso	EVC	39	4 (40)	1 (33)
	Fistula de LCR	39	4 (40)	1 (33)
	HSA	23	2 (20)	1 (33)
Tipo de drenaje (LCR)	DVE	62	6 (60)	2 (67)
	DSA Lumbar	39	4 (40)	1 (33)
Síntomas al Ingreso	Ninguno	8	-	1 (33)
	Sd. Cefalálgico	15	2 (20)	-
	Sd. de Afeción NC	15	2 (20)	-
	Mixto	62	6 (60)	2 (67)
Tipo de Inicio	Súbito	69	7 (70)	2 (67)
	Gradual	31	3 (30)	1 (33)
Antecedente de Importancia	Ninguno	15	1 (10)	1 (33)
	HAS	31	3 (30)	1 (33)
	Mixto	15	2 (20)	-
	Otros	39	4 (40)	1 (33)
Complicaciones	No	85	8 (80)	3 (100)
	Si	15	2 (20)	-
GOS	Muerte	23	2 (20)	1 (33)
	Estado Vegetativo	8	1 (10)	-
	Incapacidad	8	1 (10)	-
	Recuperación	62	6 (60)	2 (67)
Dieta	No	46	5 (50)	1 (33)
	Si	54	5 (50)	2 (67)
Antibiótico	Cefalosporina	15	2 (20)	-
	β -lactámico	15	2 (20)	-
	Mixto	70	6 (60)	3 (100)
Esteroides	No	54	6 (60)	-
	Si	46	4 (40)	3 (100)

χ^2 , prueba exacta de Fisher

Tabla 2. Variables descriptivas de la evolución				
Variable			Neuroinfección	
			NO ₁₀ (Media \pm DE)	SI ₃ (Media \pm DE)
Edad (Años)			49.20 \pm 11.31	38.67 \pm 12.06
Estancia Hospitalaria (Días)			27.20 \pm 11.67	27.00 \pm 13.45
Temperatura (°C)			36.14 \pm 0.53	37.26\pm1.08*
Leucocitos en sangre periférica	Día 1		12060 \pm 4439	13033 \pm 1858
	Día 3		10650 \pm 4640	12000 \pm 6655
	Día 5		10230 \pm 4781	12767 \pm 2723

Prueba U de Mann Whitney

* $p < 0.05$

En el grupo con neuroinfección las tinciones no evidenciaron microorganismos en la muestra 1 de LCR. Para el día 3, las tinciones de Gram evidenciaron microorganismos en 3 pacientes. También desde la tercera muestra de LCR, el cultivo mostró crecimiento de *Pseudomonas sp.* y, para el 5º día *Acinetobacter* y *Candida* (Tabla 3).

Tabla 3. Evolución de LCR		Neuroinfección	
Variable		NO ₁₀ (%)	SI ₃ (%)
Aspecto LCR 1	Hemorrágico	6 (60)	2 (67)
	Xantocrómico	2 (20)	1 (33)
	Agua de roca	2 (20)	-
Aspecto LCR 3	Hemorrágico	6 (60)	1 (33)
	Xantocrómico	2 (20)	2 (67)
	Agua de roca	2 (20)	-
Aspecto LCR 5	Hemorrágico	6 (60)	1 (33)
	Xantocrómico	2 (20)	1 (33)
	Agua de roca	2 (20)	-
	Turbio	-	1 (33)
Tinción LCR 1	Sin evidencia de microorganismos	10 (100)	3 (100)
Tinción LCR 3	Sin evidencia de microorganismos	10 (100)	-
	Gram+	-	1 (33)
	Gram -	-	2 (67)
Tinción LCR 5	Sin evidencia de microorganismos	10 (100)	-
	Gram +	-	1 (33)
	Gram -	-	2 (67)
Cultivo LCR 1	Negativo	10 (100)	3 (100)
Cultivo LCR 3	Negativo	10 (100)	-
	Positivo	-	3 (100)
Cultivo LCR 5	Negativo	10 (100)	-
	Positivo	-	3 (100)
Otros microorganismos LCR 1	No	10 (100)	3 (100)
Otros microorganismos LCR 3	No	10 (100)	2 (67)
	<i>Pseudomonas</i>	-	1 (33)
Otros microorganismos LCR 5	No	10 (100)	2 (67)
	<i>Acinetobacter, Candida</i>	-	1 (33)

χ^2 , prueba exacta de Fisher

En la **Tabla 4** se muestran los resultados del análisis citoquímico del LCR en el día 1, 3 y 5, observándose en éste último una diferencia significativa ($p=0.028$) para el grupo con neuroinfección predominando los PMN.

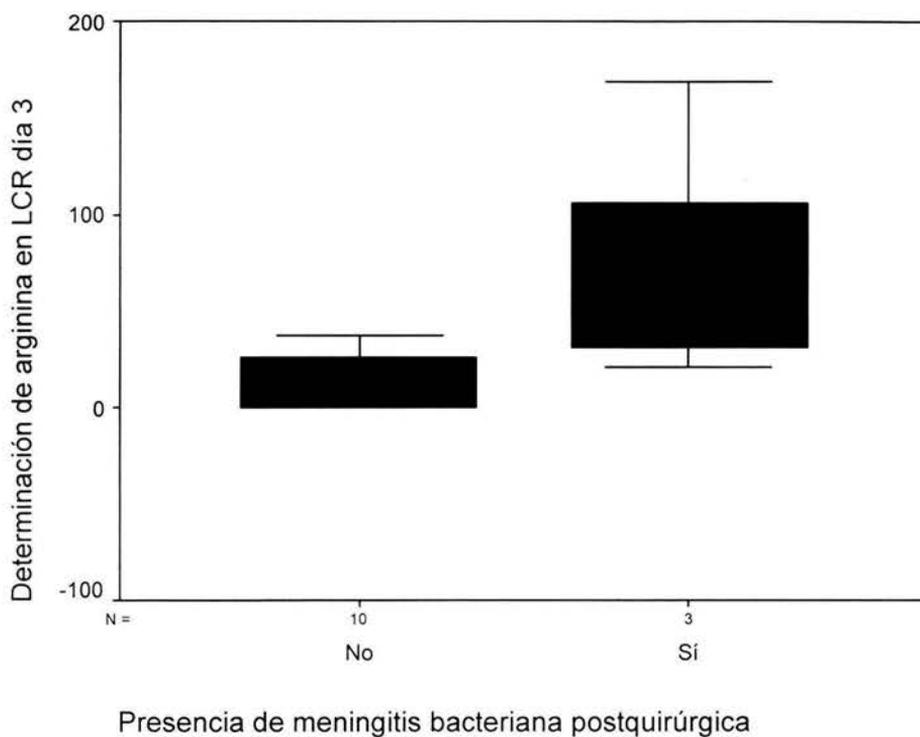
Variable (LCR)		Neuroinfección	
Variable (LCR)	Día	NO ₁₀ (Media±DE)	SI ₃ (Media±DE)
Células	1	166±321	3327±5399
	3	487±700	1923±3212
	5	230±294	968±281*
Diferencial de leucocitos	Linfocitos 1	68±31	46±48
	PMN 1	20±20	53±47
	Linfocitos 3	52±31	43±33
	PMN 3	36±27	56±33
	Linfocitos 5	66±30	57±26
	PMN 5	32±29	41±25
Glucosa	Día 1	76±32	47±38
	Día 3	51±20	58±26
	Día 5	66±18	38±38
Proteínas	Día 1	305±334	122±84
	Día 3	112±111	68±60
	Día 5	144±110	68±40

Prueba U de Mann-Whitney
* $p<0.05$

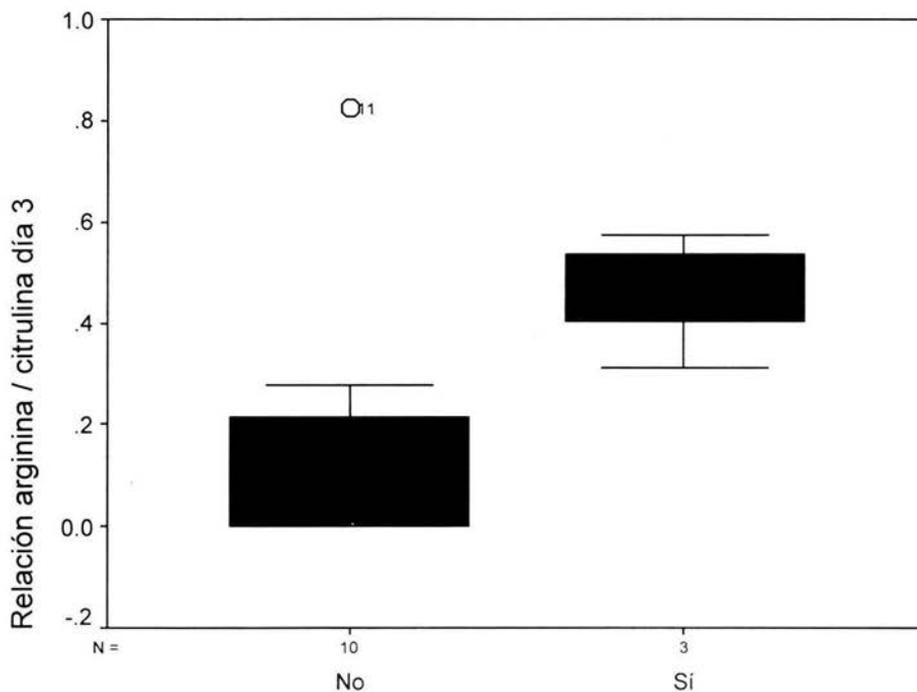
Respecto a la biosíntesis del ON, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la determinación de arginina y relación arginina/citrulina en el día 3 en el grupo con neuroinfección ($p=0.04$) (**Tabla 5**, **Gráficas 1 y 2**), no así para citrulina y nitratos en el resto de los días.

Tabla 5. Biosíntesis de Oxido Nítrico				
Variable (LCR)	Día	Neuroinfección		p
		NO ₁₀ Mediana (rangos)	SI ₃ Mediana (rangos)	
Arginina	1	4 (0-91)	28 (3-57)	0.40
	3	6 (0-38)	42 (21-169)*	0.04*
	5	12 (0-51)	21 (8-103)	0.31
Citrulina	1	57 (1-305)	53 (22-148)	0.87
	3	102 (8-272)	74 (42-543)	0.87
	5	45 (11-202)	136 (36-310)	0.24
Relación Arginina/Citrulina	1	.31 (0-9)	.39 (.2-.5)	0.87
	3	.09 (0-9)	.49 (.3-.6)*	0.04*
	5	.31 (0-1)	.23 (.16-.33)	0.87
Nitratos	1	164 (23-13312)	1000 (826-1997)	0.23
	3	1227 (72-7339)	1115 (1023-8790)	0.61
	5	341 (14-4527)	1562 (779-1963)	0.49

Prueba U de Mann-Whitney
* $p<0.05$



Gráfica 1. Arginina en LCR, día 3.



Presencia de meningitis bacteriana postquirúrgica

Gráfica 2. Relación Arginina/Citrulina, día 3.

IX. DISCUSIÓN

Los pacientes con enfermedades neuroquirúrgicas pueden requerir sistemas externos de derivación de LCR que incrementan sustancialmente el riesgo de neuroinfección. La presencia de fiebre y/o aumento en la celularidad del LCR después de procedimientos neuroquirúrgicos como el señalado pueden alertar sobre una posible neuroinfección, sin embargo, éstos cambios son difíciles de interpretar ya que pueden ser propios de la enfermedad subyacente o el procedimiento mismo, adquiriendo valor cuando tienen correlación con un cultivo de LCR positivo el cual suele ofrecer resultados en lapso de 48

a 72 horas, en tanto el diagnóstico de meningitis postoperatoria de manera más temprana podría reducir la morbimortalidad siendo deseable marcadores diagnósticos adicionales, por lo que hemos desarrollado el presente estudio piloto determinando la biosíntesis de ON en LCR después de procedimientos neuroquirúrgicos basándonos en la falta de estudios previos que avalen el empleo de tales marcadores en neuroinfección bacteriana postquirúrgica.

Se ha observado que el inicio de meningitis bacteriana después de neurocirugía puede ser más sutil que en las meningitis de la comunidad y puede existir sobreposición considerable de los datos clínicos entre meningitis aséptica y meningitis bacteriana.

Tradicionalmente, la cuenta de células en LCR ha sido considerada como herramienta diagnóstica para el diagnóstico diferencial, con una ligera pleocitosis o una relativa linfocitosis consideradas como signos de causa no bacteriana, sin embargo, Ross y colaboradores ⁽⁴⁾ reportaron que una pleocitosis >1000/ml, sólo tiene una sensibilidad de 61% y especificidad de 68% como marcador diagnóstico en LCR en pacientes neuroquirúrgicos con infección. Además, aunque 94% de pacientes con meningitis bacteriana tuvieron predominio de PMN en LCR, éste criterio sólo tuvo una especificidad de 28%. Nuestros datos muestran resultados similares, encontrando en el grupo de pacientes con neuroinfección mayor conteo celular en LCR con predominio de PMN en la muestra del día 5 en los pacientes con meningitis respecto de aquellos sin infección.

En estudios previos ⁽⁵⁾ el punto de corte establecido en el conteo de células en LCR es ≥ 1700 /ml, con una especificidad de 95% y una baja sensibilidad de 51% con predominio de PMN, considerándolo como una medida no útil ya que 67% de pacientes con

pleocitosis en LCR fue atribuible a hemorragias intracraneanas severas o al procedimiento neuroquirúrgico.

El presente estudio fue diseñado para evaluar la utilidad de la determinación de biosíntesis de ON como marcador adicional que ayude a distinguir en éste tipo de pacientes la presencia de meningitis aséptica de neuroinfección bacteriana.

Arginina, citrulina y nitratos son sintetizados en respuesta a diferentes estímulos. Se ha considerado ésta síntesis como un papel esencial en la inflamación, en particular en el espacio subaracnoideo después de influencia bacteriana como lo señala el estudio de Milstien y colaboradores ⁽²⁰⁾ sin embargo, en tal caso los pacientes incluidos tenían diferencias significativas respecto a nuestra población, particularmente en nuestro estudio los pacientes cuentan con sistema externo de derivación de LCR.

Mostramos que las más altas concentraciones del sustrato para la formación de ON se encuentran en el grupo de pacientes con meningitis bacteriana postneuroquirúrgica y sistema externo de derivación de LCR.

Los grupos de comparación (pacientes con o sin infección) no mostraron tener diferencias de relevancia en las variables demográficas. Sin embargo, observamos una diferencia de 1°C en la temperatura corporal de los pacientes con neuroinfección respecto de los no infectados, no teniendo ninguna importancia biológica para el estudio. No se observaron diferencias en el análisis citoquímico del LCR, excepto en la celularidad del LCR del día 5 en pacientes con neuroinfección como se ha señalado anteriormente.

Mostramos que arginina, citrulina y nitratos se encuentran presentes en todos los pacientes, éstos últimos con rangos muy amplios, sin embargo, en el caso particular de

Arginina y la Relación Arginina/Citrulina, ambas se encuentran elevadas en el grupo de pacientes con neuroinfección postquirúrgica, siendo notable dicha elevación hacia el día 3, no así en la determinación de los productos finales de la vía, citrulina y nitratos.

Suponemos que estos hallazgos tienen relación con la activación de dos vías simultáneas de formación de ON que suelen presentarse en pacientes con neuroinfección bacteriana.

Por un lado la mayor expresión de la NOS 2 que conduce a la formación de nitratos y citrulina y por otro lado, el aumento en la expresión de la sintetasa de argininosuccinato y del transportador de aminoácidos catiónicos, siendo precisamente la enzima sintetasa de argininosuccinato el paso limitante en ésta segunda vía de formación tanto del sustrato arginina como de nitratos, citrulina y aspartato. Como hemos señalado, en este estudio evidenciamos aumento de la concentración de arginina y de la relación arginina/citrulina en el LCR del 3er. día en pacientes que desarrollaron neuroinfección, probablemente por influencia bacteriana en la enzima limitante de la 2ª. vía señalada teniendo como resultado mayor producción de arginina y, dado que no encontramos aumento en las concentraciones de citrulina y nitratos consideramos un probable bloqueo en la expresión de la NOS 2 por uso de esteroide (dexametasona) en el grupo de pacientes con neuroinfección bacteriana en pacientes con sistema externo de derivación de LCR.

Consideramos el aumento del número de muestra para validar estas observaciones y poder así establecer la utilidad de la determinación de biosíntesis de ON en éste grupo de pacientes, sin embargo, nuestros resultados, producto de este estudio piloto, cobran importancia ya que no existen estudios previos al respecto.

CONCLUSIONES.

1. En la población con sistema externo de derivación de LCR estudiada se encontró 23 % de neuroinfección en los primeros 5 días.
2. En la población estudiada al analizar las variables clínicas y estudios de LCR corroboramos la dificultad para distinguir infección de cambios propios de la patología principal.
3. La temperatura corporal mostró 1°C de diferencia en el grupo con neuroinfección.
4. La cuenta de células en LCR al día 5 fue mayor en el grupo con neuroinfección predominando los PMN.
5. Respecto al objetivo principal del estudio y dentro de las limitaciones del tamaño de la población estudiada encontramos:
 - a. Los valores de nitratos muestran rangos muy amplios en éste tipo de pacientes.
 - b. Diferencias significativas en arginina y en la relación arginina/citrulina en el día 3 en el grupo de pacientes con neuroinfección.
6. Se requiere validar estas observaciones con una población más amplia para establecer la utilidad potencial de estos marcadores en pacientes con sistema externo de derivación de LCR y riesgo de neuroinfección.

X. ANEXOS

ABREVIATURAS:

Arginina: L-arginina
DVE: Drenaje ventricular externo (ventriculostomía)
DSA lumbar: Drenaje subaracnoideo lumbar
EVC: Enfermedad vascular cerebral
HSA: Hemorragia subaracnoidea
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LPS: Lipopolisacáridos
NOS: Sintasa del óxido nítrico
ON: Óxido nítrico
PMN: Polimorfonucleares
SNC: Sistema nervioso central

CIFRAS NORMALES EN HUMANOS EN LCR: ⁽¹⁰⁾

Arginina: 22.4 μM ⁽³⁰⁾
 20.1 μM ⁽³¹⁾
Citrulina: 14.2-21.6 μM ⁽³²⁾

**HOJA DE RECOLECCION DE DATOS
BIOSINTESIS DE OXIDO NITRICO
EN LCR DE PACIENTES CON SISTEMA EXTERNO DE DERIVACION**

NOMBRE DEL PACIENTE: _____
CLAVE DE MUESTRA: _____
FECHA DE INGRESO: dd/mm/aa _____
SEXO: M F **EDAD:** _____ años **REG HOSP** _____
DIAGNOSTICO: _____
SERVICIO DE INGRESO: _____
SERVICIO DE ESTANCIA: _____
FECHA DE INTERVENCION NEUROQUIRURGICA: _____
OBSERVACIONES: _____
TIPO DE DRENAJE [1) DVE=ventriculostomia:localización, corta o larga; 2) DSA lumbar] _____

IOT/VMA: _____
SINTOMATOLOGIA/SIGNOLOGIA DE INGRESO
 S. Cefalálgico _____ S. HIC _____
 S. Meníngeo _____ S. Convulsivo _____ Focalización _____
 S. Febril _____ S. FM _____ N. Craneales _____
 S. Infeccioso _____ S. Mov. Anormales _____ Déficit motor _____
 Otros _____

Edo. de conciencia al ingreso Alerta/Confusión / Somnolencia / Estupor / Coma

Escala de Coma de Glasgow

Respuesta motora	Respuesta verbal	Apertura ocular
6 Obedece		
5 Localiza estímulos dolorosos	5 Orientado	
4 Respuesta de retirada	4 Conversación confusa	4 Espontánea
3 Respuesta flexora	3 Palabras inapropiadas	3 A la orden verbal
2 Respuesta extensora	2 Sonidos ininteligibles	2 Al estímulo doloroso
1 Respuesta ausente	1 Respuesta ausente	1 Ausente

TIPO DE INICIO: Súbito Gradual
TIPO DE EVOLUCION: Progresivo Recurrente Otro _____
TIEMPO DE EVOLUCION: Meses _____ Días _____
CUADRO INFECCIOSO PREVIO al neurológico SI NO
DESCRIBA _____

ANTECEDENTES DE **IMPORTANCIA** _____

ENFERMEDAD **CONCOMITANTE** _____

EXPLORACION GENERAL DE INGRESO

Solo datos positivos _____

SV TA _____ **FC** _____ **FR** _____ **T** _____ °C
ESTADO DE CONCIENCIA _____
ESTADO MENTAL _____
NERVIOS CRANEALES _____
PAPILEDEMA SI NO _____
REFLEJOS **PATOLOGICOS y ATAVICOS** SI NO _____
ALTERACION MOTORA SI NO _____
SIGNOS MENINGEOS SI NO _____
SENSIBILIDAD ALTERADA NO ALTERADA _____
MOVIMIENTOS ANORMALES SI NO _____
CEREBELO ALTERADO NO ALTERADO _____

DIETA:

Día								
Tipo								
Vía								

TRATAMIENTO:**ANTIBIOTICO:**

Día								
Tipo								
Vía								
Dosis								

ESTEROIDE:

Día								
Profilaxis								
Vía								
Dosis								

OTROS:**LABORATORIO GENERAL:**

Fecha								
Hb/Hto								
Leucocitos (diferencial: N%, L%)								
Plaquetas								
Tp, TTP								
Glucosa								
Otras alteraciones relevantes								

LCR :

FECHA (y día)								
Tipo de drenaje								
Aspecto								
TI /TF								
Células								
Diferencial (L, S, E, M%)								
Proteínas								
Glucosa								
Tinciones								
Cultivos								

EVOLUCION:

ESTANCIA HOSPITALARIA _____ días

COMPLICACIONES _____

CONDICION DE EGRESO _____

Escala de egreso de Glasgow (GOS: Glasgow Outcome Scale: 1, muerte; 2, estado vegetativo; 3, incapacidad severa con dependencia funcional; 4, incapacidad moderada con independencia aunque no regresa al trabajo o escuela; y 5 con buena recuperación).

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Carmel PW, Fraser RAR, Stein BM: **Aseptic meningitis following posterior fossa surgery in children.** *J Neurosurg* 1974; 41:44-49.
2. Kaufman BA, Tunkel AR, Pryor JC, et al: **Meningitis in the neurosurgical patient.** *Infect Dis Clin North Am* 1990; 4:677-701.
3. Kim YS, Pons VG: **Infections in the neurosurgical intensive care unit.** *Neurosurg Clin North Am* 1994; 5:741-754.
4. Ross R, Rosegay H, Pons V: **Differentiation of aseptic and bacterial meningitis in postoperative neurosurgical patients.** *J Neurosurg* 1988; 69:669-674.
5. López-Cortés LF, Márquez-Arbizu R, Jiménez-Jiménez LM, et al: **Cerebrospinal fluid tumor necrosis factor- α , interleukin-1 beta, interleukin-6, and interleukin-8 as diagnostic markers of cerebrospinal fluid infection in neurosurgical patients.** *Crit Care Med* 2000; 28:215-219.
6. Quagliarello V, Scheld WM: **Bacterial meningitis: Pathogenesis, pathophysiology, and progress.** *N Engl J Med* 1992; 327:864-872.
7. McCann S.M., Kimura M., Karanth S., et al: **Nitric oxide controls the hypothalamic-pituitary response to cytokines.** *Neuroimmunomodulation* 1997; 4: 98-106.
8. Dawson TM., Dawson VL., Snyder SH.: **A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide.** *Ann Neurol* 1992; 32: 297-311.
9. Raghavan S.A.V., Dikshit M.: **Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine.** *Pharm Res* 2004; 49: 397-414.
10. Wiesinger H.: **Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system.** *Progress Neurobiol* 2001; 64: 365-391.
11. Moncada. S., Higgs, A.: **The L-arginine-nitric oxide pathway.** *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
12. Nathan C., Xie Q.W.: **Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls.** *Cell* 1994; 78: 915-918.
13. Aoki E., Semba R., Mikoshiba K., Kashiwamata S.: **Predominant localization in glial cells of free L-arginina. Immunocytochemical evidence.** *Brain Res* 1991; 547: 190-192.
14. Solomonson L.P., Flam B.R., Pendleton L.C., Goodwin B.L., Eichler D.C.: **The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. Review.** *J Exp Biol* 2003; 206: 2083-2087.
15. Muñoz-Fernández M.A., Fresno M.: **The role of tumor necrosis factor, interleukin 6, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system.** *Progress Neurobiol* 1998; 56: 307-340.
16. Luiking Y.C., Deutz N.E.: **Isotopic investigation of nitric oxide metabolism in disease.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6 (1): 103-108.

17. Ikeda M., Morita I., Murota S., Sekiguchi F., Yuasa T., Miyatake T.: **Cerebellar nitric oxide synthase activity is reduced in nervous and Purkinje cell degeneration mutants but not in climbing fiber-lesioned mice.** *Neurosci Lett* 1993; 155: 148-150.
18. Ikeda M., Sato I., Yuasa T., Miyatake T., Murota S.: **Nitrite, nitrate and cGMP in the cerebrospinal fluid in degenerative neurologic diseases.** *J Neural Transm* 1995; 100: 263-267.
19. Boje K.M., Jaworowicz D. Jr., Eaybon J.J.: **Neuroinflammatory role of prostaglandins during experimental meningitis: evidence suggestive of an in vivo relationship between nitric oxide and prostaglandins.** *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304 (1): 319-325.
20. Milstien S., Sakai N., Brew B.J., Krieger C., Vickers J.H., Saito K., Heyes M.P.: **Cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in neurologic diseases.** *J Neurochem* 1994; 63: 1178-1180.
21. Murphy S., Minor R.L. Jr., Welk G., Harrison D.G.: **Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide.** *J Neurochem* 1990; 55:349-351.
22. Murphy S., Simmons M.L., Agulló L., García A., Feinstein D.L., Galea E., Reis D.J., Minc-Golomb D., Schwartz J.P.: **Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells.** *Trends Neurosci* 1993; 16: 323-328.
23. Bolaños J.P., Peuchen S., Heales S.J.R., Land J.M., Clark J.B.: **Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes.** *J Neurochem* 1994; 63: 910-916.
24. Gross S.S., Wolin M.S.: **Nitric oxide: pathophysiological mechanisms.** *Rev Physiol* 1995; 57: 737-769.
25. Glass J.D., Johnson R.T.: **Human immunodeficiency virus and the brain.** *Rev Neurosci* 1996; 19: 1-26.
26. Hunot S., Boissiere F., Faucheux B., Brugg B., Mouattprigent A., Agid Y., Hirsch E.C.: **Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease.** *Neuroscience* 1996; 72: 355-363.
27. Iadecola C.: **Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury.** *Trends Neurosci* 1997; 20: 132-139.
28. Teasdale G., Jennet B.: **Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale.** *Lancet* 1974; 2: 81-84.
29. Jennet B., Bond M.: **Assessment of outcome after severe brain damage. A practical scale.** *Lancet* 1975; 2: 480-484.
30. Wood, J.H.: **Physiological neurochemistry of cerebrospinal fluid.** In: Lajtha, A. (Ed.), *Handbook of Neurochemistry*, vol. I, 2nd Ed. Plenum Press, New York, 1982, pp. 415-487.
31. Shih, V.E.: **Urea Cycle disorders and other congenital hyperammonemic syndromes.** In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Frederickson, D.S. (Eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 1978, pp. 362-386.
32. Gjessing, L.R., Gjesdhal, P., Sjaastad, O.: **The free aminoacids in human cerebrospinal fluid.** *J Neurochem* 1972; 19:1807-1808.